

Aus dem Institut für Medizinische Virologie  
am Fachbereich Humanmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

# **Einfluß exogener Faktoren auf die Transkriptionsregulation des Hepatitis B Virus**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der naturwissenschaftlichen Fachbereiche  
-Fachgebiet Biologie-  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Nicola Fiedler

Gießen 2001

Dekan: Prof. Dr. J. Janek

1. Berichterstatter: Prof. Dr. R. Renkawitz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. W. H. Gerlich

# Gliederung

<b><u>1 Einleitung</u></b>	<b>5</b>
<b><u>1.1 Das Hepatitis B Virus</u></b>	<b>6</b>
<u>1.1.1 Die Familie der Hepadnaviren</u>	6
<u>1.1.2 Struktur und Genomaufbau des Hepatitis B Virus</u>	6
<u>1.1.3 Transkriptionsregulation des HBV-Genoms</u>	10
<b><u>1.2 Regulation der HBV-Expression durch exogene Faktoren</u></b>	<b>15</b>
<b><u>1.3 Einfluß von Varianten auf die Transkriptionsregulation des HBV</u></b>	<b>16</b>
<b><u>1.4 Ziel der Arbeit</u></b>	<b>19</b>
<b><u>2 Material</u></b>	<b>21</b>
<b><u>2.1 Zelllinien und Bakterienstämme</u></b>	<b>21</b>
<b><u>2.2 Plasmide</u></b>	<b>22</b>
<b><u>2.3 Antikörper</u></b>	<b>24</b>
<b><u>2.4 Primer</u></b>	<b>24</b>
<b><u>2.5 Oligonukleotide</u></b>	<b>24</b>
<b><u>2.6 DNA-Längenstandards</u></b>	<b>26</b>
<b><u>2.7 Proteinmarker</u></b>	<b>27</b>
<b><u>2.8 Enzyme</u></b>	<b>27</b>
<b><u>2.9 Chemikalien</u></b>	<b>27</b>
<b><u>2.10 Geräte</u></b>	<b>28</b>
<b><u>2.11 Puffer, Lösungen und Medien</u></b>	<b>29</b>
<u>2.11.1 Klonierung</u>	29
<u>2.11.2 Ribonuklease Protection Assay (RPA)</u>	30
<u>2.11.3 Kernextraktion</u>	30
<u>2.11.4 Gelretardationsanalyse (Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA))</u>	30
<u>2.11.5 DNase I Footprint Analyse</u>	31
<u>2.11.6 SDS-Gelelektrophorese</u>	32
<u>2.11.7 Coomassie-Färbung</u>	32
<u>2.11.8 Silber-Färbung</u>	32

<u>2.11.9 Sonstige Puffer und Lösungen</u>	33
<b><u>2.12 Radionukleotide</u></b>	<b>34</b>
<b><u>3 Methoden</u></b>	<b>35</b>
<b><u>3.1 Methoden zur Zellkultur</u></b>	<b>35</b>
<u>3.1.1 Kultivieren animaler Zellen</u>	35
<u>3.1.2 Bestimmung der Zellzahl</u>	35
<u>3.1.3 Transfektion mit Lipofectamine™</u>	36
<u>3.1.4 Transfektion mit SuperFect™</u>	36
<b><u>3.2 Methoden zur Proteinanalyse</u></b>	<b>37</b>
<u>3.2.1 Zellyse mit Reporter Gen Assay Lysis Puffer (Boehringer, Mannheim)</u>	37
<u>3.2.2 BCA-Proteinbestimmung</u>	37
<u>3.2.3 CAT-Assay</u>	38
<u>3.2.4 Luziferase-Assay</u>	39
<b><u>3.3 Methoden zur RNS-Analyse</u></b>	<b>39</b>
<u>3.3.1 RNS-Extraktion aus eukaryonten Zellen</u>	39
<u>3.3.2 Herstellung einer <sup>32</sup>P-markierten DNS-Sonde</u>	40
<u>3.3.3 Northern-Blot</u>	40
<u>3.3.4 Ribonuclease Protection Assay</u>	42
<u>3.3.4.1 In vitro Transkription der RNS-Sonde (MAXIscript™, Ambion)</u>	42
<u>3.3.4.2 Reinigung der RNS-Sonde</u>	43
<u>3.3.4.3 Herstellung einer nicht radioaktiven RNS-Sonde</u> <u>(BrightStar™ Psoralen- Biotin, Ambion)</u>	44
<u>3.3.4.4 RPA (HybSpeed™ RPA, Ambion)</u>	44
<u>3.3.4.5 Nicht radioaktiver Nachweis von RPA Produkten</u> <u>(BrightStar™ BioDetect™, Ambion)</u>	45
<u>3.3.5 RT-PCR</u>	45
<b><u>3.4 Methoden zur DNS-Analyse</u></b>	<b>46</b>
<u>3.4.1 Restriktionsverdau von DNS-Fragmenten</u>	46
<u>3.4.2 Agarosegelelektrophorese</u>	46
<u>3.4.3 Polymerase Ketten Reaktion</u>	47
<u>3.4.4 Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration im Photometer</u>	48
<u>3.4.5 Bestimmung der DNS-Konzentration durch Gelelektrophorese</u>	48
<u>3.4.6 Sequenzanalyse</u>	49
<b><u>3.5 Methoden zur DNS-Klonierung</u></b>	<b>49</b>
<u>3.5.1 Aufreinigung von PCR-Produkten oder DNS aus Agarosegelen</u>	49
<u>3.5.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden</u>	49
<u>3.5.3 Ligation und Transformation</u>	49

<a href="#"><u>3.5.4 Analytische Plasmid-Präparation</u></a>	50
<a href="#"><u>3.5.5 Plasmid-Maxipräparation</u></a>	50
<a href="#"><u>3.5.6 Proteinase K Verdau</u></a>	51
<a href="#"><u>3.5.7 Phenol/Chloroform-Extraktion</u></a>	51
<a href="#"><u>3.5.8 Ethanol-Präzipitation</u></a>	51
<b><a href="#"><u>3.6 Methoden zur Identifikation von Protein-DNS Interaktionen</u></a></b>	<b>52</b>
<a href="#"><u>3.6.1 Herstellung des Kernextraktes aus HepG2 Zellen</u></a>	52
<a href="#"><u>3.6.2 <i>In vitro</i> SP6/T7 Transkription/Biotin <i>in vitro</i> Translation</u></a>	53
<a href="#"><u>3.6.3 Gelretardationsanalyse (Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA))</u></a>	53
<a href="#"><u>3.6.3.1 Markierung der Oligonukleotide</u></a>	54
<a href="#"><u>3.6.3.2 Bindungsreaktion</u></a>	54
<a href="#"><u>3.6.3.3 Gelelektrophorese</u></a>	55
<a href="#"><u>3.6.4 Trocknen von Polyacrylamidgelen</u></a>	55
<a href="#"><u>3.6.5 DNase I Footprint Analyse</u></a>	56
<a href="#"><u>3.6.5.1 Herstellung eines <sup>32</sup>P-markierten DNS-Fragments für die DNase I Footprint Analyse</u></a>	56
<a href="#"><u>3.6.5.2 Bindungsreaktion und DNase I Verdau</u></a>	57
<a href="#"><u>3.6.5.3 Sequenziergelelektrophorese</u></a>	57
<b><a href="#"><u>3.7 Methoden zur Proteinanalyse</u></a></b>	<b>58</b>
<a href="#"><u>3.7.1 Isolation DNS bindender Proteine anhand eines Biotin/Streptavidin Affinitätssystems</u></a>	58
<a href="#"><u>3.7.1.1 Affinitäts Isolation</u></a>	59
<a href="#"><u>3.7.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese</u></a>	60
<a href="#"><u>3.7.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen</u></a>	61
<a href="#"><u>3.7.4 Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen</u></a>	61
<a href="#"><u>3.7.5 Western-Blot</u></a>	61
<a href="#"><u>3.7.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix assisted laser desorption/ ionisation time-of-flight mass spectrometry)</u></a>	62
<a href="#"><u>3.7.7 Peptid Massenfingerprint Analyse</u></a>	63
<a href="#"><u>3.7.8 <i>In-situ</i> Verdau</u></a>	63
<a href="#"><u>3.7.9 Kapillar-HPLC</u></a>	64
<a href="#"><u>3.7.10 N-terminale Sequenzanalyse: Edman-Abbau</u></a>	64
<a href="#"><u>3.7.11 Peptidsequenzierung</u></a>	64
<b><a href="#"><u>4 Ergebnisse</u></a></b>	<b>65</b>
<b><a href="#"><u>4.1 HBx wirkt einer p53-vermittelten Repression des HBV-Enhancer I entgegen</u></a></b>	<b>65</b>
<b><a href="#"><u>4.2 HBx beeinflusst die Menge an gebildeter p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS nach UV-Bestrahlung in AML12 Zellen</u></a></b>	<b>67</b>

<u>4.3 Einfluß von Transkriptionsfaktoren auf die Transkriptionsregulation von HBV-Enhancer II/Core-Promotor Varianten</u>	70
<u>4.4 Versuche zur Identifikation einer stromabwärts der 8bp-Deletion gelegenen Bindungsstelle für die Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie</u>	76
<u>4.5 EMSA mit <i>in vitro</i> translatiertem COUP-TF1</u>	81
<u>4.6 DNase I Footprint Analysen zur Identifikation einer DNS-Bindungsstelle</u>	84
<u>4.7 Affinitätsisolation von DNS-bindenden Proteinen</u>	84
<u>4.8 Peptid Massenfingerprint Analyse</u>	85
<u>5 Diskussion</u>	91
<u>5.1 HBx wirkt einer p53-vermittelten Repression der Transkription entgegen</u>	91
<u>5.2 Unterschiedliche Regulation der Expression von p21<sup>waf/cip/sdi</sup> und p53 in stabil HBx exprimierenden AML12 und HepG2 Zellen</u>	94
<u>5.3 Einfluß von Transkriptionsfaktoren auf die Transkriptionsregulation einer HBV-Enhancer II/Core-Promotor Variante</u>	95
<u>6 Zusammenfassung</u>	106
<u>7 Literaturverzeichnis</u>	108
<u>Abkürzungen</u>	132

## 1 Einleitung

Trotz weltweiter Impfaktionen gegen das Hepatitis-B-Virus (HBV) seit Beginn der 80er Jahre in Regionen der Welt, in denen die chronische Hepatitis endemisch ist (Kane, 1995; Viviani et al., 1997), sterben weiterhin jährlich etwa 1 Mio. Menschen an den Folgen einer HBV-Infektion (Zuckerman and Zuckerman, 2000). Durch die staatlich geförderte Impfung aller Kleinkinder in mehr als 105 Ländern konnte das Auftreten von Neuinfizierten deutlich reduziert werden (Zuckerman and Zuckerman, 2000), die große Anzahl von 350-400 Millionen chronischer HBV-Träger kann davon jedoch nicht mehr profitieren. Nach Schätzung der Weltgesundheitsorganisation (WHO) hatten weltweit mehr als zwei Milliarden Menschen Kontakt mit dem Hepatitis B Virus (Zuckerman and Zuckerman, 2000). Bei bis zu 10 % der Infizierten entwickelt sich eine chronische HBV-Infektion, die nach Jahrzehnten mit der Entwicklung einer Zirrhose oder einem hepatozellulären Karzinom (HCC) enden kann. Dabei tragen chronische HBV-Träger ein über 100-fach höheres Risiko gegenüber nicht infizierten bzw. HBV-immunen Personen, an einem HCC zu erkranken (Beasley et al., 1981).

Bei einer HBV-Infektion können neben einer Vielzahl klinischer Symptome unterschiedlichste HBV-Titer im Serum der Patienten auftreten. Es kommt zu inapparenten Krankheitsverläufen mit vollständiger Ausheilung sowie zu stillen Infektionen ohne serologische HBV-Marker bis hin zu akuten bzw. fulminanten Infektionen mit Leberversagen. Während bei vielen HBV-Trägern ohne Symptome Titer von bis zu  $10^{10}$  Genomäquivalente (GE) pro ml im Serum auftreten, zeigen einige Fälle einer stillen HBV-Infektion nur geringe Titer von  $10^2$  GE/ml. Eine genaue Ursache für das Auftreten dieser Unterschiede der Virusproduktion *in vivo* ist bis heute nicht bekannt. Für HBV wurde eine Vielzahl natürlicher Varianten beschrieben, bei denen Deletionen, Punktmutationen und Insertionen innerhalb des viralen Genoms auftraten (Günther et al., 1999). Trotz ihres meist geringen Anteils innerhalb einer Viruspopulation scheinen diese Varianten eine nicht unbedeutende Rolle bei der Entstehung der unterschiedlichen Krankheitsverläufe zu spielen.

## 1.1 Das Hepatitis B Virus

### 1.1.1 Die Familie der Hepadnaviren

Das Hepatitis B Virus (HBV) gehört zu einer Familie von Viren, die aufgrund ihres Lebertropismus (*griechisch* = Hepar) und ihres DNS-Genoms (*englisch* = DNA) als Hepadnaviren bezeichnet werden. Wie in Tabelle 1 gezeigt, werden ihre Vertreter weiter in die Gruppe der Orthohepadnaviren, die Säugetiere als Wirte nutzen, und die Avihepadnaviren, die Vögel infizieren, aufgeteilt. Die Tatsache, daß alle aufgeführten Hepadnaviren mittels reverser Transkription eines RNS-Prägenoms replizieren, weist auf eine phylogenetische Verwandtschaft zu den Retroviren hin und führte zu dem Beinamen der Pararetroviren.

### 1.1.2 Struktur und Genomaufbau des Hepatitis B Virus

Das Hepatitis B Virus ist ein umhülltes Virus mit einem ca. 3,2 kB großen DNS-Molekül als Genom (Abb. 1.1). Die infektiösen Viruspartikel zeigen im Elektronenmikroskop bei Negativkontrastierung einen Durchmesser von 42-45 nm (Dane et al., 1970). In hydratisierter Form beträgt der Durchmesser 52 nm (Jursch, 2000). Innerhalb der Hüllmembran befindet sich ein ikosaedrisches Nukleokapsid, das aus 180 bzw. 240 Untereinheiten des Core-Proteins HBc (Böttcher et al., 1997; Conway et al., 1997; Crowther et al., 1994) besteht. Die Virion-DNS besteht aus einem zirkulären und partiell doppelsträngigen DNS-Molekül (Summers et al., 1975), welches nicht kovalent geschlossen ist, sondern durch eine Überlappungsregion zwischen DR1 und DR2 (direct repeat 1 bzw. 2) zusammengehalten wird (Abb. 1.2). Das Genom beinhaltet vier konservierte offene Leserahmen (ORF), die sich teilweise überlappen und alle in einer Richtung abgelesen werden. Sie kodieren für vier Transkriptionsprodukte von 3,5/2,4/2,1 und 0,9 kB Länge. Es existiert nur ein einzelnes Polyadenylierungs-Signal (poly A), so daß alle HBV-RNS-Transkripte das gleiche 3' Ende besitzen (Abb. 1.2.).

Der größte offene Leserahmen (Abb. 1.2) kodiert für die virale Polymerase, die mit ihren vier Domänen neben ihrer Funktion als DNS-abhängige DNS-Polymerase noch als terminales Protein (Primase), reverse Transkriptase und RNase H aktiv ist. Der Primase-Anteil ist kovalent an das 5'-Ende des kodierenden DNS-Strangs gebunden (Gerlich and Robinson, 1980), während die reverse Transkriptase mit dem 3'-Ende nicht kovalent assoziiert ist.

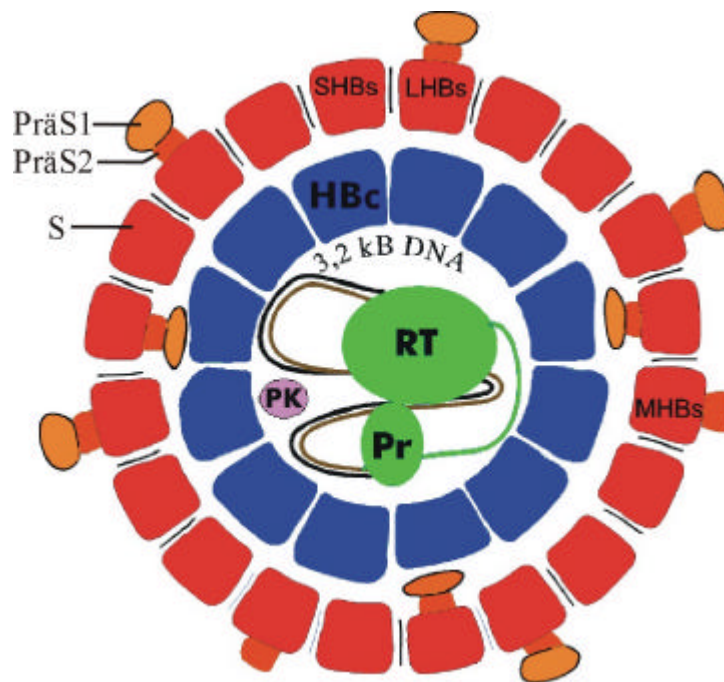


**Tab. 1: Übersicht der bisher bekannten Hepadnaviren, ihrer Wirte und gebräuchlichen Abkürzungen.**

Orthohepadnavirus	Wirt	Literatur
Hepatitis B Virus (HBV)	Mensch <i>Homo sapiens sapiens</i>	(Dane et al., 1970)
Chimpanzee Hepatitis B Virus (ChHBV)	Schimpanse <i>Pan troglodytes</i>	(Vaudin et al., 1988)
Gibbon Hepatitis B Virus (GiHBV)	Weißhandgibbon <i>Hylobates lar</i>	(Norder et al., 1996)
Orangutan Hepatitis B Virus (OuHBV)	Orang-Utan <i>Pongo pygmaeus pygmaeus</i>	(Warren et al., 1999)
Gorilla Hepatitis B Virus (GoHBV)	Gorilla <i>Gorilla gorilla</i>	(Grethe et al., 2000)
Woolly Monkey Hepatitis B Virus (WMHBV)	Wollaffe <i>Lagothrix lagotricha</i>	(Lanford et al., 1998)
Woodchuck Hepatitis Virus (WHV)	Waldmurmeltier <i>Marmota monax</i>	(Summers et al., 1978)
Ground Squirrel Hepatitis Virus (GSHV)	Kalifornisches Erdhörnchen <i>Spermophilus beecheyi</i>	(Marion et al., 1980)
Arctic Squirrel Hepatitis Virus (ASHV)	Arktisches Hörnchen <i>Spermophilus parryi kennicotti</i>	(Testut et al., 1996)
Avihepadnavirus		
Duck Hepatitis B Virus DHBV	Pekingente <i>Anas domesticus</i>	(Mason et al., 1980)
Grey Teal Hepatitis B Virus (GTHBV)	Weißkehlente <i>Anas gibberifrons gracilis</i>	(Li et al., 1998b)
Heron Hepatitis B Virus (HHBV)	Graureiher <i>Ardea cinerea</i>	(Sprengel et al., 1988)
Maned Duck Hepatitis B Virus (MDHBV)	Mähnenente <i>Chenonetta jubata</i>	(Li et al., 1998b)
Ross Goose Hepatitis Virus (RGHV)	Zwergschneegans <i>Anser rossii</i>	(Shi et al., 1993)
Snow Goose Hepatitis B Virus (SGHBV)	Schneegans <i>Anser caerulescens</i>	(Chang et al., 1999)
Stork Hepatitis B Virus (STHBV)	Weißer Storch <i>Ciconia ciconia</i>	(Pult et al., 1998)

Ein weiterer Leserahmen kodiert für die Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs (Small, Middle und Large Hepatitis B Virus Surface Protein), welche zusammen mit einer Lipidmembran des Endoplasmatischen Retikulums die Virushülle bilden. Die Proteine haben einen identischen Carboxyterminus, unterscheiden sich jedoch am Aminoternus. Das SHBs besteht somit aus der S-Region während das MHBs um die PräS2-Domäne und das LHBs um die Domänen PräS1 und PräS2 verlängert ist (Abb. 1.2). Der dritte Leserahmen mit seinen zwei Startcodons kodiert für das virale Core-Protein (HBc) und durch die Benutzung des stromaufwärts der präC-Region gelegenen Translationsstartes für das HBe-Protein (HBeAg). Durch eine Aggregation der Core-Proteine zu Kapsidpartikeln kommt es zur Verpackung des RNS-Prägenoms zusammen mit der viruseigenen Polymerase (Hirsch et al., 1990) und einem zusätzlichen zellulären Faktor einer Proteinkinase (Albin and Robinson, 1980; Gerlich et al., 1982; Kann and Gerlich, 1994; Kann et al., 1993). Nach amino- und carboxyterminaler Verkürzung des HBe-Proteins (Bruß and Gerlich, 1988; Strandring et al., 1988) wird dieses von den infizierten Zellen sezerniert und ist im Serum nachweisbar (Magnius and Espmark, 1972). Der vierte offene Leserahmen kodiert für das HBV-X-Protein (HBx) (Galibert et al., 1979), dessen Name sich daher ableitet, daß zum Zeitpunkt seiner Entdeckung keine homologen zellulären oder viralen Proteine bekannt waren, durch die sich die Funktion von HBx hätte einordnen lassen. Tatsächlich ist die genaue Funktion von HBx bis heute weitgehend unbekannt. HBx wird für die Virusproduktion *in vitro* von transfizierten Zellen nicht benötigt (Blum et al., 1992). Im Gegensatz dazu findet *in vivo* ohne das Woodchuck Hepatitis X Protein keine Infektion im Walddarmmeltier statt (Chen et al., 1993; Zoulim et al., 1994). Ähnlich wie die frühen Regulationsgene anderer Viren – z.B. das E1A-Gen der Adenoviren, HTLV-tax oder das Tumorantigen von SV40 - ist das HBx in der Lage, neben den HBV-eigenen Promotoren sowohl *in vivo* als auch *in vitro* eine Reihe viraler und zellulärer Promotoren zu transaktivieren (Balsano et al., 1994; Spandau and Lee, 1988; Twu and Schloemer, 1987); eine Übersicht findet sich bei (Rossner, 1992). Diese Fähigkeit wird unter Umständen durch eine Protein-Protein Interaktion vermittelt, da HBx selbst keine DNS-bindenden Fähigkeiten aufweist. Eine Transaktivierung innerhalb des Zytoplasmas könnte indirekt über die Stimulation verschiedener zellulärer Signaltransduktionskaskaden wie der der Proteinkinase C (PKC) (Kekulé et al., 1993), Ras-Raf-MAPK (Benn and Schneider, 1994; Natoli et al., 1994b) oder JAK/STAT (Lee and Yun, 1998) vermittelt werden. Außerdem wurde

eine direkte Interaktion mit Transkriptionsfaktoren der bZIP-Familie (Antunovic et al., 1993; Barnabas et al., 1997; Maguire et al., 1991; Williams and Andrisani, 1995) oder Bestandteilen der zellulären Transkriptionsmaschinerie wie TBP, TFIIB und RPB5 beobachtet (Cheong et al., 1995; Haviv et al., 1998b; Lin et al., 1997; Qadri et al., 1995), die im Zellkern lokalisiert sind.



**Abb. 1.1: Schematische Darstellung des Hepatitis B Virus (HBV).** *Aufbau des HBV-Partikels.* SHBs, MHBs, LHBs: Small, Middle und Large Hepatitis B Virus surface protein (kleines, mittleres und großes HBV-Hüllprotein); S, PräS1 und PräS2: S-, PräS1- und PräS2-Domäne der HBV-Hüllproteine; HBc: Hepatitis B core Protein (HBV-Nukleokapsidprotein); RT, Pr: Reverse Transkriptase und Primase-Anteile der HBV-Polymerase; PK: Proteinkinase.

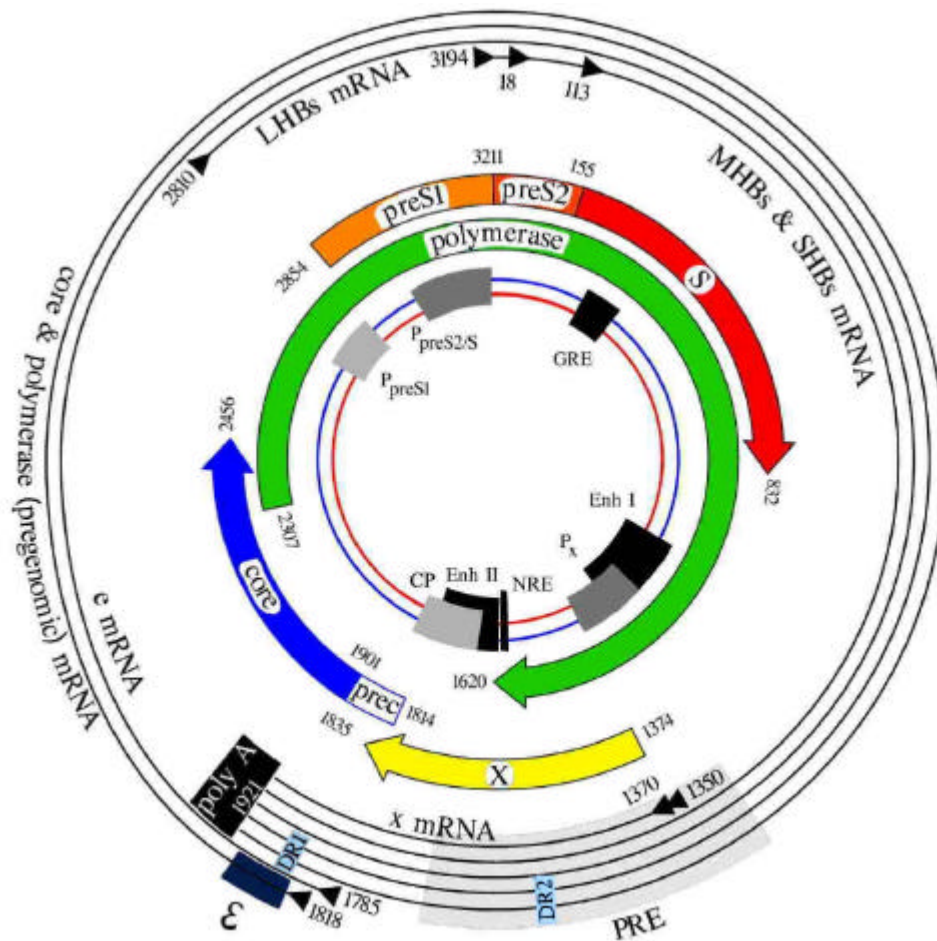
Verschiedene Befunde deuten auf eine tumorigene Wirkung des HBx hin. Es konnte gezeigt werden, daß HBx alleine unter der Kontrolle seines eigenen Promotors in der Lage ist, verschiedene Zelllinien zu transformieren (Koike et al., 1989; Seifer et al., 1991). Bei Studien mit einem bestimmten transgenen Mausstamm, welcher das X-Gen unter der Kontrolle seines eigenen Promotors exprimiert, entwickelten die Mäuse nach 8-10 Monaten Karzinome (Kim et al., 1991). In Gegenwart eines zweiten transformierenden Faktors wie z.B. einem Hepatokarzinogen oder dem Onkogen c-myc konnte in anderen HBx-transgenen Mauslinien ein erhöhtes Auftreten von Leberkarzinomen beobachtet werden (Slagle et al., 1996; Terradillos et al., 1997).

Außerdem kann HBx einen transaktivierenden Effekt ausüben, von denen auch Promotoren für zelluläre Protoonkogenen wie c-jun, c-fos und c-myc, Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sowie interzelluläre Adhäsionsmoleküle betroffen sein können (Balsano et al., 1991; Hu et al., 1992; Kim et al., 1996; Lee et al., 1998b; Menzo et al., 1993; Natoli et al., 1994a; Natoli et al., 1994b). Eine konstitutive Stimulation von potentiell Proliferations fördernden Signaltransduktionskaskaden wie dem der PKC, Ras-Raf-MAPK, NF- $\kappa$ B, Src oder JAK/STAT durch HBx könnte ebenfalls zu einer Entgleisung der zellulären Wachstumskontrolle führen. Zusätzlich wurde für das HBx-Protein *in vitro* eine Interaktion mit dem Tumorsuppressorprotein p53 beschrieben, die zahlreiche Funktionen von p53 wie Apoptoseinduktion, DNS-Reparatur und Regulation des G1-/S-Phase Übergangs betreffen kann (Elmore et al., 1997 ; Feitelson et al., 1993; Jia et al., 1999; Takada et al., 1997; Takada et al., 1995; Truant et al., 1995; Wang et al., 1994). Hierbei wird vermutet, daß HBx die tumorsupprimierende Funktion von p53 inhibiert. Für einer Reihe von Transkriptionsfaktoren anderer Viren wie z.B das E1B der Adenoviren, das große Tumorantigen des SV40 (Concen and Cole, 1994) und das E6 der humanen Papillomviren HPV16 und HPV18 (Huibretse and Scheffner, 1994) konnte gezeigt werden, daß diese über verschiedene Mechanismen ebenfalls eine Inaktivierung des p53 bewirkten.

### 1.1.3 Transkriptionsregulation des HBV-Genoms

Die Transkription des HBV-Genoms erfolgt von den vier Promotoren präCore/Core-Promotor (Cp), präS1-Promotor (PpreS1), S-Promotor (PpreS2/S auch präS2-Promotor genannt) und dem X-Promotor (Px) (Abb. 1.2). Der präS1-Promotor kontrolliert die Transkription der 2,4 kB Messenger-RNS (mRNS), welche für das große Oberflächenprotein LHBs kodiert. Der S-Promotor kontrolliert die Transkription der 2,1 kB mRNS. Durch das Benutzen von zwei verschiedenen Startcodons werden hier die Oberflächenproteine SHBs und MHBs translatiert. Während der präS1-Promotor den Start der Transkription mittels einer klassischen TATA-Box vermittelt (Raney, 1994), reguliert der S-Promotor diese ohne ein TATA-Box Motiv mittels zweier Initiationssequenzen (Zhou and Yen, 1991a). Der präCore/Core-Promotor (nt 1702-1805) reguliert die Expression der 3,5 kB mRNS. Sie dient als Template für die reverse Transkription bei der Replikation und beinhaltet neben dem größten offenen Leserahmen, welcher für die virale Polymerase kodiert, noch den Leserahmen für

das Core Antigen (HBcAg). Auch hier treten zwei verschiedene Startcodons auf, so daß neben dem Core-Protein noch das e-Antigen (HBeAg) translatiert wird. Der X-Promotor (nt 1230-1376) reguliert die Transkription der X-mRNS.

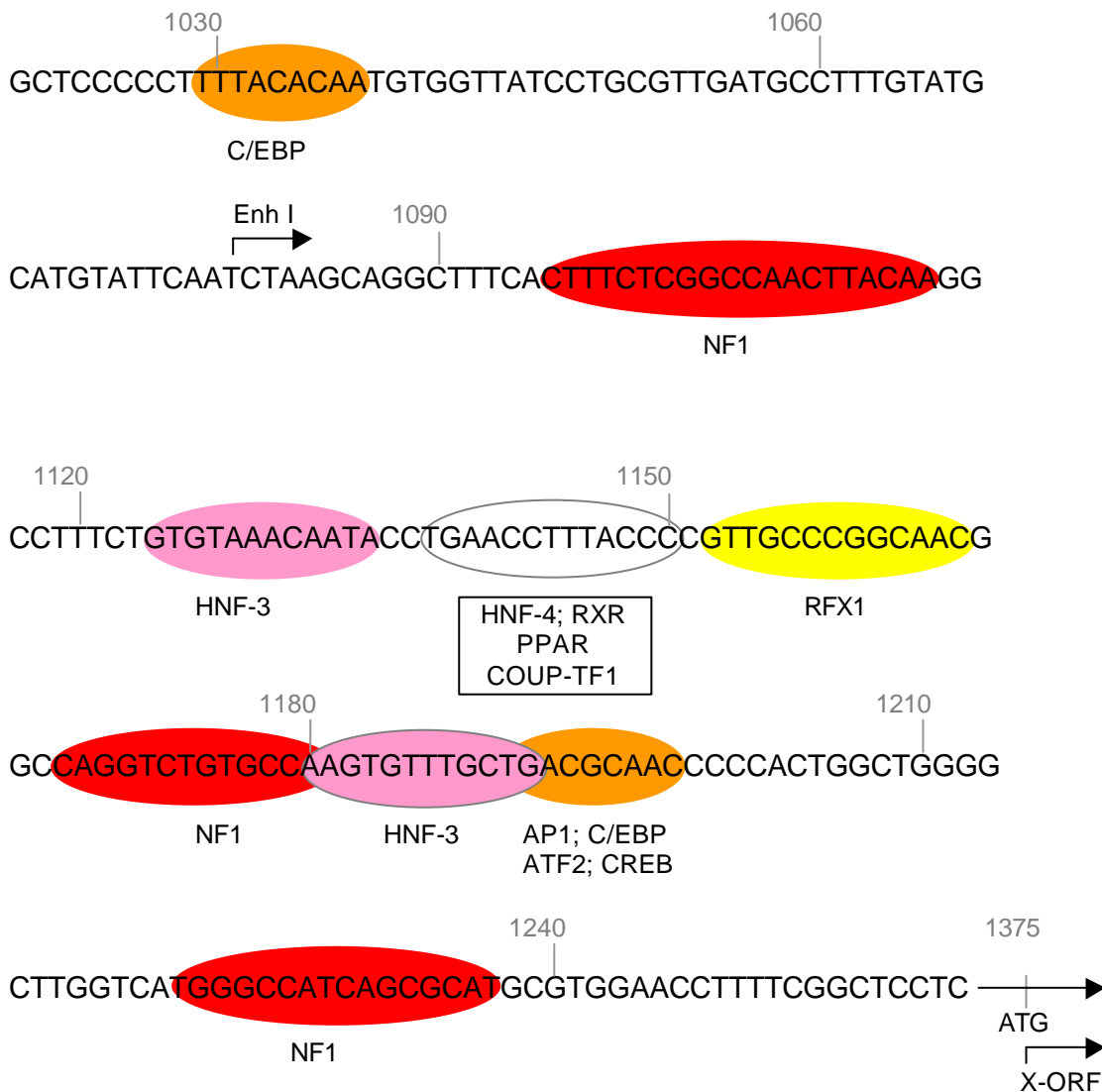


**Abb. 1.2: Genomorganisation des HBV:** In der Mitte der Abbildung sind die offenen Leserahmen und die regulatorischen Elemente des HBV-Genoms dargestellt. Rot: Leserahmen für die Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs (Small, Middle und Large Hepatitis B Virus Surface Protein). Blau: Leserahmen für Core-Protein, Grün: Leserahmen für Polymerase, Gelb: Leserahmen für X-Protein. Grau: P<sub>preS1</sub>: präS1-Promotor, P<sub>preS2/S</sub>: S-Promotor, CP: präCore/Core-Promotor, P<sub>X</sub>: X-Promotor. Schwarz: Enh: Enhancer, NRE: Negativ-regulatorisches Element, GRE: Glucocorticoid-responsibles Element. Außen sind die transkribierten HBV-RNS-Produkte gezeigt. Grau: PRE: Post-transkriptionales-regulatorisches Element, Schwarz: ε: Verpackungssignal, poly A: Polyadenylierungsstelle. Hellblau: DR1 Direct repeat 1 und DR2 Direct repeat 2. Schwarze Dreiecke: stellen die unterschiedlichen 5'-Enden der HBV-RNS dar.

Die Aktivität der Promotoren wird durch die zwei Enhancer-Elemente des HBV reguliert. Der Enhancer I (Enh I) (Shaul et al., 1985; Tognoni et al., 1985) liegt an Position 1080-1234 und überlappt mit dem X-Promotor, während der Enhancer II

(Enh II) (Yee, 1989) sich im Bereich des präCore/Core-Promotors an Position 1636-1741 befindet. Enhancer bewirken eine Aktivierung der Genexpression, indem sie mittels intermediärer Faktoren Signale zwischen einem Aktivator am Enhancer und einem basalen Transkriptionsfaktor am Promotor übermitteln. Ihre Funktion ist in gewissen Grenzen positions- und orientierungsunabhängig. Sie können sowohl 5' als auch 3' von der Transkriptions-Initiationssequenz in Introns, Exons und sogar auf der transkribierten mRNS lokalisiert sein (Ogbourne and Antalis, 1998). Die Tatsache, daß beide HBV-Enhancer in der Lage sind, alle vier HBV-Promotoren zu regulieren, verdeutlicht die Bedeutung des engen Zusammenspiels beider Enhancer, um eine effiziente Expression bzw. Replikation zu gewährleisten (Su and Yee, 1991). Lebertropismus ist ein wesentliches Merkmal der HBV-Infektion. Während der Enhancer I sowohl in humanen Hepatomzelllinien als auch in anderen humanen Zellen aktiv ist (Ben-Levy et al., 1989; Shaul et al., 1985), scheint der Enhancer II für den strikten Lebertropismus verantwortlich zu sein (Shaul et al., 1985). Hierbei ist vor allem die Transkription der prägenomischen RNS und die virale Replikation von der Expression leberspezifischer Transkriptionsfaktoren abhängig (Tang and McLachlan, 2001). So konnte z.B in HBV-transgenen Mäusen eine Transkription und Replikation des Virus Genoms nur in den Hepatozyten und innerhalb der Pars convoluta des Nierentubulus nachgewiesen werden (Guidotti et al., 1995). Innerhalb der beiden Enhancer Regionen wurden zahlreiche Bindungsstellen sowohl für leberspezifische als auch für ubiquitäre Transkriptionsfaktoren identifiziert (Kosovsky et al., 1998). So konnte z.B für den Enhancer I eine Bindung der Transkriptionsfaktoren NF-1 (nuclear factor 1), AP-1 (activator protein 1) und C/EBP (CCAAT-enhancer binding protein) (Ben-Levy et al., 1989; Lopez-Cabrera et al., 1990) gezeigt werden (Übersicht in Abb. 1.3). Die teilweise ubiquitäre Expression dieser Transkriptionsfaktoren könnte eine weitere Erklärung dafür sein, warum der HBV-Enhancer I nicht nur in Hepatomzelllinien, sondern auch in anderen Zelllinien Aktivität aufweist. Für den Enhancer II konnten neben Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie (Raney et al., 1997) HNF-4 (hepatocyte nuclear factor), RXR (retinoid X receptor), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) und COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor) (Wang et al., 1989; Yu and Mertz, 1997) noch weitere wie z.B für Sp1 (SV40 promotor protein 1), HNF-3 (Johnson et al., 1995; Li et al., 1995), FTF (fetoprotein transcription factor) (Gilbert et al., 2000; Ishida et al., 2000) und das TATA-box-binding Protein (TBP) (Chen et al.,

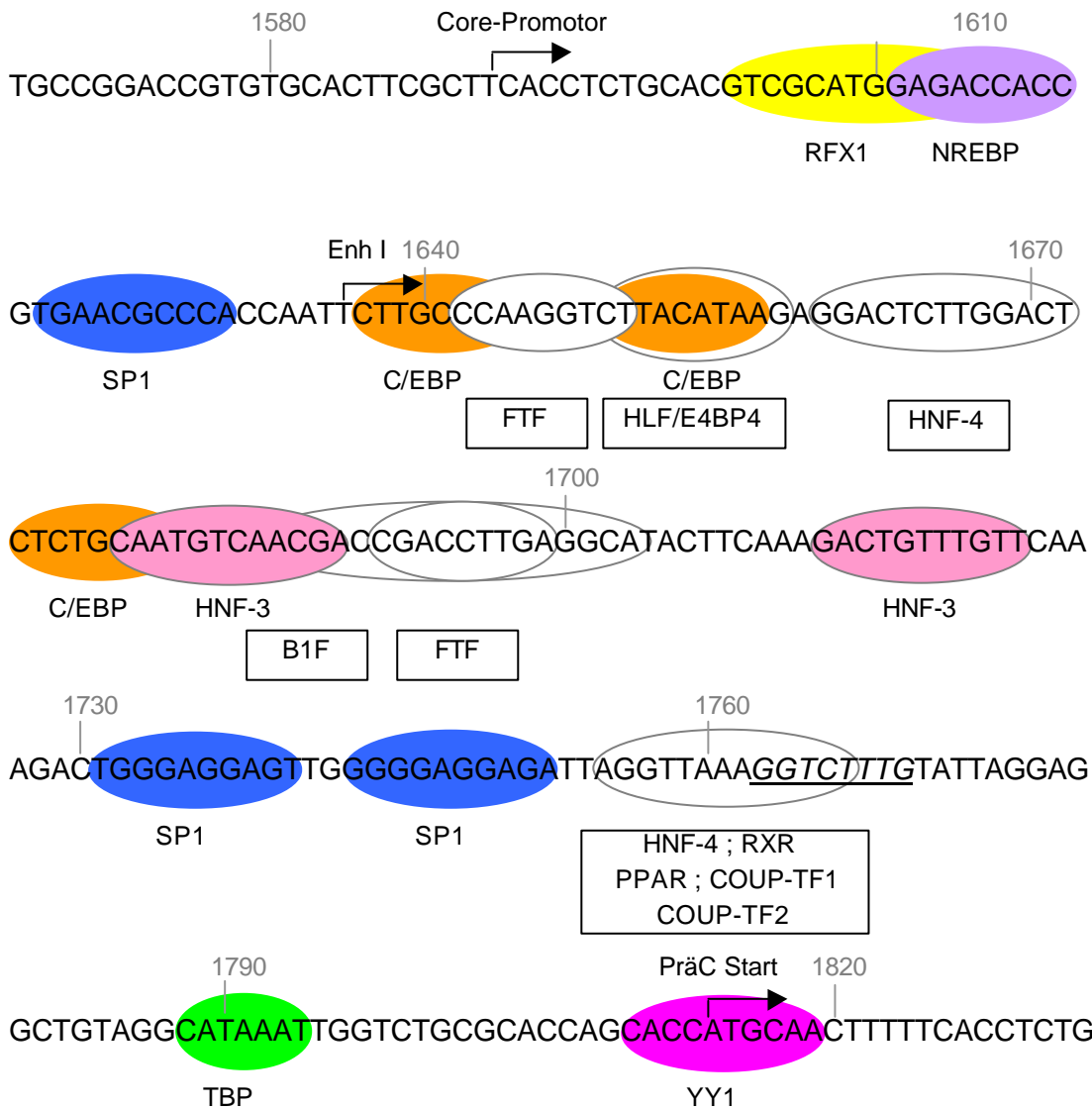
1995) beschrieben werden (Übersicht in Abb. 1.4). Dabei können die Transkriptionsfaktoren, der Kernrezeptorfamilie, sowohl aktivierende als auch reprimierende Aktivität entfalten (Burcin et al., 1994; Raney et al., 1997). Alleine für das Kernrezeptor-responsible Element (NRRE für nuclear receptor responsible element) an Position 1755-1768 wurde die Bindung von mindestens 5 Mitgliedern dieser Familie gezeigt (Raney et al., 1997; Yu and Mertz, 1997).



**Abb. 1.3: Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Region des HBV-Enhancer I.** Es wurde die Sequenz Y07587 (Genotyp D) verwendet. Die Abbildung zeigt die Enhancer I Region (nt 1080-1234) (Shaul et al., 1985) mit ihren Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren. (Übersicht in (Kosovsky et al., 1998)), ATF2 (activating transcription factor 2) (Choi et al., 1997), CREB (cAMP response element binding factor) (Williams and Andrisani, 1995).

Neben der Kontrolle durch die Bindung der beschriebenen zellulären Transkriptionsfaktoren verfügt das Hepatitis B Virus über weitere eigene *cis*- und

*trans* wirkende Elemente zur Regulation seiner beiden Enhancer. Stromaufwärts des Enhancers II an Position 1613-1636 (Kernelement 1616-1621) befindet sich ein Negativ-regulatorisches Element (NRE), welches die Enhancer II Aktivität reprimiert (Lo and Ting, 1994). So führte z.B eine Überexpression des NREBP (NRE binding Protein) in transienten Transfektionsversuchen zu einer Repression der HBV-Genexpression und der Virusproduktion (Sun et al., 2001).



**Abb. 1.4: Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren in der Region des HBV-Enhancer II/Core-Promotors.** Es wurde die Sequenz Y07587(Genotyp D) verwendet. Die Abbildung zeigt die HBV-Enhancer II/Core-Promotor-Region (Enhancer II nt 1636-1741, Core-Promotor nt 1591-1851) mit ihren Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren (Kosovsky et al., 1998). YY1(Transkriptionsfaktor Yin-Yang 1) (Nakanishi-Matsui et al., 2000), FTF (fetoprotein transcription factor) (Gilbert et al., 2000), HLF (hepatic leukemia factor) (Ishida et al., 2000), E4BP4 (bZIP type of transcription factor) (Lai and Ting, 1999), TBP (TATA-box-binding Protein) (Chen et al., 1995), RFX1 (Siegrist et al., 1993), NREBP (NRE binding Protein) (Sun et al., 2001), B1F (Xie et al., 2001). Unterstrichen und Kursiv: 8bp-Deletion (nt 1763-1770) (Repp et al., 1992).



Außerdem wurde ein Post-transkriptionales-regulatorisches Element (PRE) identifiziert (Abb. 1.2), welches durch eine direkte oder indirekte Interaktion mit zellulären RNS Prozessierungs- bzw. Transportfaktoren den Export der HBV-mRNS aus dem Zellkern in das Zytoplasma unterstützt (Huang and Liang, 1993; Huang and Yen, 1995; Huang, 1994). Eine *trans* Regulation der Expression des Hepatitis B Virus erfolgt über das viruseigene HBx-Protein, welches die HBV-eigenen Promotoren transaktiviert. Diese Transaktivierung wird u.a. über den Enhancer I vermittelt (Doria et al., 1995; Rossner, 1992), indem HBx infolge einer Protein-Protein Interaktion mit anderen Transkriptionsfaktoren deren DNS Bindungsspezifität positiv beeinflusst. So konnte Maguire et. al (1991) zeigen, daß HBx eine Bindung der Transkriptionsfaktoren CREB und ATF-2 an den Enhancer I fördert. Außerdem wird dem großen Hüllprotein (LHBs) des Hepatitis B Virus neben seiner Aufgabe beim Assembly der viralen Partikel eine Funktion als Transaktivator viraler Promotoren zugesprochen (Hildt et al., 1996). Bei *in vitro* Versuchen mit LHBs konnte eine bis zu 10-fache Steigerung der Aktivität des S-Promotors beobachtet werden (Zhichang et al., 1997).

## 1.2 Regulation der HBV-Expression durch exogene Faktoren

Auch exogene Faktoren wie z.B Hormone scheinen einen direkten Einfluß auf die HBV-Expression zu haben. Ein Angriffspunkt hierfür ist das stromaufwärts des Enhancers I liegende Glucocorticoid responsive element (GRE), welches durch die Bindung eines intrazellulären Glukokortikoid-Rezeptor Komplexes eine Aktivierung des Enh I bewirken kann (Kosovsky et al., 1998). *In vitro* Versuche mit HBV-DNS transfizierten Zellen ergaben nach einer Exposition mit dem Glukokortikoidanalog Dexamethason eine Erhöhung der Expression viraler RNS (Chou et al., 1992). Bestimmte spontan *in vivo* auftretende Mutationen innerhalb des GRE führen zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Glukokortikoiden (Suzuki et al., 1998). Diese Mutationen könnten eine Ursache für die erhöhte HBV-Replikation als Folge einer Glukokortikoid Verabreichung mit anschließendem fulminantem Verlauf einer chronischen HBV-Infektion sein (Hamada et al., 1993; Koga et al., 1992). Die Tatsache, daß bei einer annähernd gleichen Anzahl weiblichen wie männlichen chronischen HBV-Trägern deutlich mehr Männer als Frauen an einem Hepatozellulären Krazinom (HCC) erkranken, führte außerdem zu der Annahme, daß hierbei neben den erhöhten Risikofaktoren bei Männern wie Rauchen und

Alkoholkonsum auch Sexualhormone eine wichtige Rolle spielen könnten (Yu et al., 2000). Versuche mit HBV-transgenen Mäusen ergaben, daß die männlichen Mäuse im Vergleich zu den weiblichen Mäuse deutlich mehr HBsAg mRNA in der Leber und HBsAg im Serum exprimierten. Die Reduktion der Expression infolge einer Kastration der Mäuse konnte durch eine Injektion von Testosteron wieder gesteigert werden (Breibart et al., 1993; Farza et al., 1987). Auch Alkohol scheint einen Einfluß auf die HBsAg-Expression zu haben. So konnte bei HBV-positiven Alkoholikern zwar HBV-DNS, jedoch kein HBsAg nachgewiesen werden. Anschließend Versuche mit HBsAg-positiven, transgenen Mäusen, welche über einen Zeitraum von 18 Wochen Alkohol verabreicht bekamen, zeigten ebenfalls eine deutliche HBsAg-Reduktion im Vergleich zu den Kontrollmäusen (Nalpas et al., 1992). Des Weiteren scheint Hypoxie ein Stimulus für die HBV-Expression zu sein, da sie in humanen HepG2 Zellen zu einer gesteigerten Aktivität des Enhancer I führt (Lee et al., 2000a). Oxidativer Stress, z.B durch Hydrogenperoxid, welches im Verlauf einer akuten bzw. chronischen Hepatitis von den entzündeten Zellen freigesetzt wird, führt dagegen zu einer negativen Regulation der HBV-Genexpression (Zheng and Yen, 1994). Auch für das Tumorsuppressorprotein p53 konnte ein negativer Einfluß auf die HBV-Genexpression beschrieben werden. p53 bewirkt über eine Protein-Protein Interaktion eine Repression des Enhancers II (Lee et al., 1998a). Außerdem konnte auch für den Enhancer I eine Repression durch p53 festgestellt werden. Hierbei scheint p53 jedoch über eine direkte Bindung an eine spezifische Sequenz (E-Element) innerhalb des Enhancers I eine Repression der Aktivität zu bewirken. Interessanterweise haben Mutationen innerhalb dieses Bereiches eine positive Stimulation des Enhancers zur Folge (Ori et al., 1998). Demnach können auch HBV-Varianten einen Einfluß auf die HBV-Transkriptionsregulation haben.

### **1.3 Einfluß von Varianten auf die Transkriptionsregulation des HBV**

Für das Hepatitis B Virus konnten zahlreiche Varianten identifiziert werden (Günther et al., 1999). HBV-Varianten sind zu unterscheiden von Genotypen. Genotypen haben sich über eine lange Zeit viraler Evolution im Wirt entwickelt, möglicherweise über Jahrtausende (Simmonds, 2001). Varianten entstehen innerhalb von kurzen Perioden aufgrund der Immunantwort des Wirtes und des Selektionsdrucks durch eine Therapie oder Prophylaxe. Viele der dabei auftretenden Mutationen entstehen während der Virusreplikation. Geht man davon aus, daß hochvirämische HBV-Träger

am Tag bis zu  $10^{13}$  Viruspartikel produzieren und die Reverse Transkriptase eine Fehlerrate von  $1:10^4$ - $10^5$  aufweist (Roberts et al., 1988), so können täglich  $10^9$  Genome mit einer neuen Mutation auftreten.

Neben Punktmutationen treten auch Deletionen und Insertionen innerhalb des HBV-Genoms auf (Günther et al., 1999). Diese können z.B. beim Template „switching“ während der reversen Transkription entstehen. Die hierbei gebildeten fehlgepaarten Zwischenprodukte werden durch eine anschließende korrekte Basenpaarung stabilisiert (Kunkel and Bebenek, 2000). Durch ein Pausieren der Polymerase bei der DNS-Replikation kann es zum Strangabbruch und somit zum Verlust von Basen kommen. Auch beim Spleißen der prägenomischen RNS können Fehler auftreten, die Deletionen und Insertionen zur Folge haben (Su et al., 1989; Suzuki et al., 1989). Außerdem können sekundär Strukturen der RNS wie z.B. „Stem-loops“ bei der reversen Transkription Ursache für einen Verlust bzw. Zugewinn von Basenabfolgen sein (Kidd and Kidd Ljunggren, 1996). Auch bei einer Spaltung bzw. Ligation von HBV-DNS durch die Topoisomerase I (Wang and Rogler, 1991) oder während nicht homologer Rekombination von linearer HBV-DNS, die bei aberranter Genomreplikation entsteht (Yang and Summers, 1995; Yang et al., 1996), können Fehler auftreten.

Simultane Veränderungen an mehreren Positionen des dominanten HBV-Genoms einer Population werden häufiger bei gleichzeitiger Infektion eines Patienten mit stark verschiedenen HBV-Genomen, Genotypen oder Subtypen beobachtet als bei Neumutationen (Bahn et al., 1997; Gerner et al., 1998; Günther et al., 1992; Kremsdorf et al., 1996; Tran et al., 1991). Ursprung solcher simultanen Veränderungen könnte das Auftreten von Virus Varianten innerhalb unterschiedlicher Kompartimente der Leber bzw. anderer Zellen sein. So konnten in einigen Patienten Sequenz Differenzen zwischen HBV-Genom aus Serum, der Leber oder peripheral blood mononuclear cells (PBMC) beobachtet werden (Brind et al., 1997; Dienes et al., 1995; Laskus et al., 1997; Lopez-Alcorocho et al., 1994).

Da das HBV-Genom aufgrund seiner Größe von nur 3200 Basen und seinen teilweise überlappenden Leserahmen äußerst kompakt ist, wirken sich solche Mutationen meist auf mehrere Funktionen aus.

Ein Großteil der publizierten HBV-Varianten wurden im S-Bereich, dem Leserahmen für die drei Oberflächenproteine SHBs, MHBs und LHBs (Carman, 1997), identifiziert. Hierbei sind vor allem solche Mutationen von großer Bedeutung, die eine

Veränderung der Antigenstruktur des HBV zur Folge haben, denn innerhalb dieses Bereiches sind neben dem Hauptantigen, der Determinante a, eine Reihe anderer immunrelevanter Epitope lokalisiert. Das HBsAg, insbesondere die Determinante a, stellt derzeit die Basis für die erhältlichen Impfstoffe und für die in der HBV-Diagnostik verwendeten AntiHBsAg-Tests dar. Von großer klinischer Relevanz sind deshalb die wiederholt beschriebenen Escape-Mutanten (Günther et al., 1999; Harrison, 1998) nach Verabreichung von HBV-Immunglobulinen. Diese konnten erstmals nach einer perinatalen kombinierten Immunprophylaxe bei Kindern von HBV-positiven Müttern beobachtet werden (Zanetti et al., 1988). Auch im Bereich des Core-Gens konnten Escape-Varianten, aufgrund von Mutationen welche zu einer Veränderung der dort befindlichen T-Zell-Epitope führen, beschrieben werden (Günther et al., 1999; Harrison, 1998). Nach einer Langzeit Lamivudin Therapie konnte bei einigen chronischen HBV Patienten eine Resistenz gegenüber dem Medikament mit einer deutlichen Verschlechterung der Hepatitis beobachtet werden (Neau et al., 2000). Lamivudin ist ein Nucleosid Analog, welches bei der Behandlung von HIV- (Human immunodeficiency virus) und HBV-Infektionen eingesetzt wird. Es inhibiert die Reverse Transkriptase. Ursache für die beobachtete Resistenz gegenüber Lamivudin ist eine Mutation im präCore Bereich (Neau et al., 2000; Doo and Liang, 2001), welche eine Substitution innerhalb des Tyrosin-Methionin-Aspartat-Aspartat (YMDD) Motivs der HBV-Polymerase bewirkt. Interessanterweise zeigte die Variante eine deutlich geringere Replikationsrate im Vergleich zum Wildtyp. Auch im Bereich des S-Promotors konnten zwei Deletionen beschrieben werden, die zu einer Verminderung der Viruskonzentration im Serum führten (Bock et al., 1997).

Zusätzlich konnten im Bereich des Enhancer II/Core-Promotors Mutationen beschrieben werden, die einen Einfluß auf die HBV-Replikation und die Expression der viralen Proteine haben. Die am häufigsten beschriebene Doppelmutation an den Positionen 1762 (A nach T) und 1764 (G nach A) wurde in chronisch infizierten Patienten beobachtet (Kaneko et al., 1995; Okamoto et al., 1994; Sato et al., 1995). Die Folge dieser Mutation ist eine verminderte Transkription der präC-RNS, eine deutliche Reduktion der HBeAg Expression und eine gesteigerte Replikation (Buckwold et al., 1996). Daneben konnten noch weitere Punktmutationen zwischen den Positionen 1744 und 1804 des Core-Promotors beschrieben werden (Buckwold et al., 1997). Einige dieser Punktmutationen liegen im Bereich von Bindungsstellen für zelluläre Transkriptionsfaktoren und haben aufgrund des Verlustes oder der

Neubildung einer Bindungsstelle einen positiven oder negativen Einfluß auf die Transkription (Gerner et al., 1999; Guo et al., 1993; Li et al., 1998a). Des Weiteren konnten Insertionen und Deletionen, kombiniert mit Punktmutationen, gefunden werden, die zu einer erhöhten Virusreplikation führten (Günther et al., 1996b; Pult et al., 1997). Die in dieser Arbeit untersuchte 8bp-Deletion der nt 1763-1770 im Bereich des Enhancer II/Core-Promotors wurde erstmals in Gießen bei immunsupprimierten Kindern entdeckt, die sich gegenseitig unter einer zytostatischen Chemotherapie mit HBV infizierten (Repp et al., 1993). Später konnte diese Deletion in weiteren Serien bei Nierentransplantatempfängern (Günther et al., 1996a) nachgewiesen werden. Auch die Deletion der Position 1763-1770 zeichnet sich durch eine erhöhte Replikationsrate des Virus und einer Abnahme der präC-mRNS und des HBeAg aus. Daneben konnten weitere 8bp-Deletionen beschrieben werden, die sowohl eine Aktivierung als auch eine Reduktion der Transkription der prägenomischen, präC-RNS und Virus Replikation zur Folge haben (Kohno et al., 2000; Okamoto et al., 1994). Über den Mechanismus, wie die am häufigsten beschriebene Deletion der Basen 1763-1770 zu einer verstärkten Replikation *in vitro* führen soll, gibt es keine gesicherten Daten. Günther et al. (1996) fanden Hinweise, daß durch die Deletion eventuell eine HNF-1 Bindungsstelle entstehen könnte. Demgegenüber legten die Daten von S. Fischer (2000) nahe, daß die Deletion zum Wegfall der Bindung eines möglicherweise reprimierenden Transkriptionsfaktors führen könnten.

#### **1.4 Ziel der Arbeit**

Der Verlauf einer Hepatitis B Virus Infektion wird durch eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst. Das Spektrum reicht von einer inapparenten Hepatitis mit Ausheilung bis zu chronisch, symptomatischen Verläufen. In chronisch infizierten Patienten werden HBV-DNS-Konzentrationen zwischen  $10^2$  bis  $10^{10}$  Genomäquivalente/ml gefunden. In dieser Arbeit sollte der Einfluß zweier, die Expression des Hepatitis B Virus beeinflussender Faktoren untersucht werden.

HBV-infizierte Hepatozyten werden infolge einer Apoptose-Induktion durch zytotoxische T-Zellen eliminiert. Ein für bestimmte Formen der Apoptose wesentliches Protein ist das Tumorsuppressorprotein p53. Aus eigenen Vorarbeiten und Arbeiten anderer Gruppen war bekannt, daß das Hepatitis B Virus X Protein (HBx) in transienten Transfektionen p53-Funktionen antagonisieren kann. Da in transienten Transfektionen aber unphysiologisch hohe Mengen HBx exprimiert

werden, sollten stabil HBx exprimierende Zelllinien für diese Untersuchungen verwendet werden. Nach Überprüfung der Eignung der Zelllinien sollte endogenes p53 durch UV-Bestrahlung induziert werden. Unter diesen weitestgehend natürlichen Bedingungen sollte dann untersucht werden, ob HBx auch in sehr niedriger, physiologischer Konzentration Funktionen von p53 aufheben kann und somit z.B. HBV-infizierte Zellen vor der Elimination durch das Immunsystem schützen kann.

Weiterhin sollten Varianten des Virus untersucht werden, die in Patienten unter Immunselektion gefunden wurden. Diese Varianten mit einer Deletion von 8 Nukleotiden im Enhancer II des HBV, führen *in vitro* und wahrscheinlich auch *in vivo* zu einer verstärkten Replikation des Virus. Vorarbeiten aus unserer Gruppe berichteten, daß die 8bp-Deletion zum Wegfall der Bindung eines unbekannten Transkriptionsfaktors führen soll. Die Arbeitsgruppe von Dr. H. Will berichtete demgegenüber, daß die 8bp-Deletion eine neue Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor HNF-1 kreieren solle. In dieser Arbeit sollte versucht werden, den molekularen Mechanismus, der zur verstärkten Replikation des HBV durch die 8bp-Deletion führt, näher zu charakterisieren.

## **2 Material**

### **2.1 Zelllinien und Bakterienstämme**

Alle Zelllinien wurden vom Institut für Medizinische Virologie, Gießen, zur Verfügung gestellt.

#### **HepG2**

Diese Zelllinie wurde aus dem Biopsiematerial eines primären humanen Leberkarzinoms isoliert (Aden et al., 1979). Es handelt sich um hochdifferenzierte Leberparenchymzellen, die keine HBV-DNS enthalten. Die verwendeten Zellen wurden ursprünglich von D. Ganem (UCSF San Francisco, USA) bezogen.

#### **AML12**

Bei dieser Zelllinie handelt es sich um hochdifferenzierte immortalisierte murine Hepatozyten (Wu et al., 1994). Sie wurde aus der Leber von Mäusen etabliert, die transgen für Transforming Growth Factor  $\alpha$  sind.

#### **AML12-HBx9**

AML12-HBx9 Zellen wurden etabliert, indem ein Expressionsvektor für HBx in die zuvor beschriebenen AML12 Zellen transfiziert wurde (Oguey et al., 1996). Im Gegensatz zu HBx-RNS konnte kein HBx-Protein in diesen Zellen nachgewiesen werden. Bei den AML12-HBx9 Zellen handelt es sich um eine transformierte Zelllinie. Sie wächst in Weichagar und induziert Tumore in Nacktmäusen (Oguey et al., 1996).

#### **HepG2-CMVX8**

Die HepG2-CMVX8 Zelllinie entstand durch Transfektion der Linie HepG2 mit dem Plasmid prCCMVX. Die Expression von HBx wurde mittels RT-PCR nachgewiesen. Die Zelllinie wurde von dem Doktoranden L. Fink am Institut für Medizinische Virologie in Gießen hergestellt (Fink, 1997).

#### **HepG2-CMVXM2**

Diese Zelllinie wurde durch Transfektion von HepG2 Zellen mit dem Plasmid prCCMVX 1443<sup>-</sup> (L. Fink) gewonnen. prCCMVX 1443<sup>-</sup> ist, außer einem durch Mutagenese eingeführten Stopcodon an Codon 24, identisch mit prCCMVX. Diese Veränderung führt zur Expression eines verkürzten, nicht transaktivierenden und nicht transformierenden HBx-Proteins. Diese Zelllinie wurde von dem Doktoranden L. Fink am Institut für Medizinische Virologie in Gießen hergestellt (Fink, 1997).

### **Die Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue MRF<sup>™</sup>**

Genotyp:  $\Delta(\text{mrcA})183$ ,  $\Delta(\text{mrcCB-hsdSMR-mm})173$ ,  $\text{endA1}$ ,  $\text{supE44}$ ,  $\text{thi-1}$ ,  $\text{recA1}$ ,  $\text{gyrA96}$ ,  $\text{relA1}$ ,  $\text{lac [F}^+ \text{, proAB, lac1}^q\Delta\text{M15, TN10, (tet}^r\text{)]}$

Die Bakterien wurden von Stratagene, Heidelberg, bezogen und kompetent (nach (Perbal, 1988)) von Dipl. Biologin K. Schmidt, Institut für Medizinische Virologie, Gießen, zur Verfügung gestellt.

## **2.2 Plasmide**

### **pcDNA3**

Dieser 5,4 kB große Vektor (Invitrogen, über ITC Biotechnology, Heidelberg) leitet sich von dem Plasmid prCCMV ab. Die Genexpression wird von der CMV major immediate early Enhancer/Promotor-Region reguliert, des Weiteren enthält er das Polyadenylierungssignal des bovinen Wachstumshormons (BGH), ein Neomycin-Resistenzgen, ein Ampicillin-Resistenzgen sowie die T7- und Sp6-Promotoren.

### **pcDNA3CAT**

Dieses Plasmid wird als Positivkontrolle in den CAT-Versuchen benutzt. In die *NotI* Schnittstelle des Expressionsvektor pcDNA3 (Invitrogen) wurde der Leserahmen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) kloniert. Dieses Plasmid wurde bei der Bestellung des Vektors pcDNA3 gratis von der Firma Invitrogen mitgeliefert.

### **pS9**

Dieses Plasmid enthält den in den Vektor pBLCAT 2 (Luckow and Schütz, 1987) klonierten HBV-Promotor/Enhancer I von Position 1040 (*EcoRV*) bis 1372 (*NcoI*). Dieser Vektor wurde von Dr. S. Schaefer (Institut für Medizinische Virologie, Gießen) konstruiert und zur Verfügung gestellt.

### **pwwpCAT**

Dieses Plasmid wurde von B. Vogelstein zur Verfügung gestellt. Es enthält den Leserahmen für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase unter der Kontrolle des kompletten Enhancer/Promotor Bereichs des  $\text{p21}^{\text{waf/cip/sdi}}$ -Gens (el Deiry et al., 1995).

### **pcDNA3p21(murine)**

Der Leserahmen für das murine  $\text{p21}^{\text{sdi/cip/waf}}$  wurde mittels RT-PCR, den Primern waf-as und waf-s (R. SCHUSTER), die das Start- und Stopkodon von Ratten-p21 sowie eine *EcoRI*-Schnittstelle umfassen, aus aufgereinigter mRNA (AML12 Zellen)



amplifiziert. Anschließend wurde das Amplifikat mit *EcoRI* geschnitten über ein Agarosegel aufgereinigt und mit dem ebenfalls mit *EcoRI* geschnittenen Vektor pcDNA3 ligiert und in *E.coli* XL1-blue transformiert. Eine anschließende Sequenzierung und die Homologiesuche in der Genbank ergab die Identität der klonierten p21-cDNS zu Mäuse-p21.

#### **pCMVsdi I (human)**

Dieser Vektor enthält den kompletten Leserahmen für das humane p21<sup>sdi/cip/waf</sup>. Die Vollängen cDNA des p21<sup>sdi/cip/waf</sup>-Gens wurde über *SpeI* in den Vektor prCCMV *SpeI* kloniert (Nakanishi et al., 1995).

#### **pcDNA3-wt-HBx(Koe)**

Der komplette HBx-ORF von Position 1374-1838 wurde aus dem Plasmid pKoeX43(wt) amplifiziert und über *HindIII* und *XbaI* in die MCS des eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Der Vektor wurde von der Doktorandin Silke Fischer am Institut für Medizinische Virologie in Giessen hergestellt (Fischer, 2000).

#### **pcDNA3-8del-HBx(Moe)**

Der eine 8bp-Deletion enthaltene HBx-ORF von Position 1374-1838 wurde aus dem Plasmid pMoeX2/1(wt) amplifiziert und über *HindIII* und *XbaI* in die MCS des eukaryonten Expressionsvektor pcDNA3 kloniert. Der Vektor wurde von der Doktorandin Silke Fischer am Institut für Medizinische Virologie in Giessen hergestellt (Fischer, 2000).

#### **pFLCOUP-TF1**

Dieser Vektor enthält den Leserahmen für den Transkriptionsfaktor COUP-TF1 und wurde für die *in vitro* Transkription/Translation von COUP-TF1 verwendet. Der Leserahmen ist über *EcoRI* und *SmaI* in das Plasmid pGEM<sup>®</sup>-72f(+) kloniert (Wang et al., 1989).

#### **puc 19**

puc 19 (New England Biolabs, Schwalbach) ist ein kleines *E.coli* Plasmid mit einer hohen Kopienzahl. puc19 wurde nach einem Verdau mit *HpaII* als Marker bei der DNase I Footprint Analyse verwendet.

## 2.3 Antikörper

### sc 273 x (Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg)

Hierbei handelt es sich um einen affinitätsgereinigten polyclonalen Kaninchen Antikörper. Das Kaninchen wurde mit einem in *E.coli* produzierten Vollängen-TFIID TATA-box-binding Protein (TBP) immunisiert.

### Anti-HBs-C 20/02

Affinitätsgereinigter Antikörper aus Hybridomaüberstand, der konformationsabhängig die Aminosäuresequenz 120-160 des kleinen Hüllproteins erkennt. Er reagiert nur mit der gruppenspezifischen Determinante a (persönliche Mitteilung Prof. W.H. Gerlich).

## 2.4 Primer

### rat-waf-s

5' GGA ATT CAT GTC CGA TCC TGG TGA TGT 3'

### rat-waf-as

5' GGA ATT CTC AGG GCT TTC TCT TGC AGA 3'

## 2.5 Oligonukleotide

Alle verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech AG (Ebersberg) bezogen und mit dH<sub>2</sub>O in einer Konzentration von 100 pmol/μl angesetzt.

### 8bp-Deletion (HBV-d8-1756-1780 -s) (S. Fischer)

5'-CGGTTAAATATTAGGAT-3'

### 8bp-Deletion (HBV-d8-1756-1780 -as) (S. Fischer)

5'-CTAGATCCTAATATTTAACCGCATG-3'

### 8bp-Deletion (HBV-d8-1756-1780 -s)

5'-CGGTTAAATATTAGGAT-3'

### 8bp-Deletion (HBV-d8-1756-1780 -as) 5' biotin-markiert

5'-CTAGATCCTAATATTTAACCGCATG-3'

### wt (HBV-1756-1780-s) (S. Fischer)

5'-CGGTTAAAGGTCTTTGTATTAGGAT-3'

### wt (HBV-1756-1780-as) (S. Fischer)

5'-CTAGATCCTAATACAAAGACCTTTAACCGCATG-3'

### wt (HBV-1756-1780-s)

5'-CGGTTAAAGGTCTTTGTATTAGGAT-3'

**wt (HBV-1756-1780-as) 5' biotin-markiert**

5'-CTAGATCCTAATAACAAAGACCTTTAACCGCATG-3'

**unspezifisches Oligonukleotid as**

5'-CTAGATCATAGATAACAACCTACGTCCTACATG-3'

**unspezifisches Oligonukleotid s**

5'-TAGGACGTAGGTTGTTATCTATGAT-3'

**wt (HBV-1755-1805-bs-s)**5'-GAT CCT TAG GTT AAA GGT CTT TGT ATT AGG AGG CTG TAG GCA TAA ATT GGT  
CTG CGA-3'**wt (HBV-1755-1805-bs-as)**5'-GAT CTC GCA GAC CAA TTT ATG CCT ACA GCC TCC TAA TAC AAA GAC CTT TAA  
CCT AAG-3'**wt (HBV-1755-1805-bs-s)**5'-GAT CCT TAG GTT AAA GGT CTT TGT ATT AGG AGG CTG TAG GCA TAA ATT GGT  
CTG CGA-3'**wt (HBV-1755-1805-bs-as) 5' biotin-markiert**5'-GAT CTC GCA GAC CAA TTT ATG CCT ACA GCC TCC TAA TAC AAA GAC CTT TAA  
CCT AAG-3'**8bp-Deletion (bs-HBVd8-1755-1805-s)**

5'-GAT CTT AGG TTA AAT ATT AGG AGG CTG TAG GCA TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**8bp-Deletion (bs-HBVd8-1755-1805-as)**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAT GCC TAC AGC CTC CTA ATA TTT AAC CTA A-3'

**8bp-Deletion (bs-HBVd8-1755-1805-TBP-s) (ohne TATA-box (Locker and Buzard, 1990))**5'-GAT CTT AGG TTA AAT ATT AGG AGG CTG TAG GGC TAA ATT GGT CTG CGC A-3'**8bp-Deletion (bs-HBVd8-1755-1805-TBP-as)**5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAG CCC TAC AGC CTC CTA ATA TTT AAC CTA A-3'**8bp-Deletion (HBVd8-dTBP-1755-1805-s)**

5'-GAT CTT AGG TTA AAT ATT AGG AGG CTG TAG GCA TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**8bp-Deletion (HBVd8-dTBP-1755-1805-as) 5' biotin-markiert**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAT GCC TAC AGC CTC CTA ATA TTT AAC CTA A-3'

**TBP-s**

5'-GAT GGG GCT ATAAAA GGG-3'

**TBP-as**

5'-GAT GCC CTT TTA TAG CCC-3'

**coup-cons-n2-s**

5'-GAT CCT TAG GGG TCA AAG GTC AAA TGG AA-3'

**coup-cons-n2-as**

5'-GAT\_CTT CCA TTT GAC CTT TGA CCC CTA AG-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg1-s**

5'-GAT CTT AGA ATA AAT ATT AGG AGG CTG TAG GGC TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg1-as**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAG CCC TAC AGC CTC CTA ATA TTT ATT CTA A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg2-s**

5'-GAT CTT AGG TTA AAT ATT AGG AGA ATG TAG GGC TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg2-as**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAG CCC TAC ATT CTC CTA ATA TTT AAC CTA A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg3-s**

5'-GAT CTT AGG TTA AAT ATT AGG AGG CTG TAG AAC TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg3-as**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAG TTC TAC AGC CTC CTA ATA TTT AAC CTA A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg4-s**

5'-GAT CTT AGG TTA AAT ATT AGG AGG CTG TAG GGC TAA ATT GAA CTG CGC A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg4-as**

5'-GAT CTG CGC AGT TCA ATT TAG CCC TAC AGC CTC CTA ATA TTT AAC CTA A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg1-2s**

5'-GAT CTT AGA ATA AAT ATT AGG AGA ATG TAG GGC TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg1-2as**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAG CCC TAC ATT CTC CTA ATA TTT ATT CTA A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg1-3s**

5'-GAT CTT AGA ATA AAT ATT AGG AGG CTG TAG AAC TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg1-3as**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAG TTC TAC AGC CTC CTA ATA TTT ATT CTA A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg2-3s**

5'-GAT CTT AGG TTA AAT ATT AGG AGA ATG TAG AAC TAA ATT GGT CTG CGC A-3'

**bs-HBVd8-1755-1805-TBP-gg2-3as**

5'-GAT CTG CGC AGA CCA ATT TAG TTC TAC ATT CTC CTA ATA TTT AAC CTA A-3'

## 2.6 DNA-Längenstandards

*Marker 8 pUC Mix:* Der Marker wurde von MBI Fermentas (St. Leon-Rot) bezogen und enthält DNS-Fragmente folgender Größe (in bp): 1114; 900; 692; 501/489; 404; 320; 242; 190; 147; 124; 110; 67; 37/34/34/26/19.

*1 kB DNS Leiter:* Der Marker wurde von Life Technologies (Karlsruhe) bezogen und enthält DNS-Fragmente folgender Größe (in bp): 12216; 11198; 10180; 9162; 8144; 7126; 6108; 5090; 4072; 3054; 2036; 1636; 1018; 517; 506; 396; 344; 298; 220; 201; 154; 134; 75.

## 2.7 Proteinmarker

Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham, Braunschweig)

## 2.8 Enzyme

Alle verwendeten Enzymen mit den dazugehörigen Puffern wurden von den Firmen New England Biolabs (Schwalbach), Roche (Mannheim), Stratagene (Leimen) oder Gibco BRL (Paisley, Schottland), bezogen.

## 2.9 Chemikalien

Acrylamid	Serva, Heidelberg
Agarose (SEAKEM)	FMC, Biozym, Hess. Oldendorf
Ampicillin	Hoechst, Frankfurt
APS (Ammoniumpersulfat)	Serva, Heidelberg
BSA (Serumalbumin)	PIERCE, Rockford USA
Bind-Silane (=3-Methacryloxypropyltrimethoxy-silane)	Serva, Heidelberg
Brillant-Kresylblau	Merck, Darmstadt
DMEM (4,5 g/l Glukose)	Bio Whittaker, Verviers, Belgien
DTT	Serva, Heidelberg
Fötales Kälberserum (FKS)	PAA, Linz, Österreich
HAMS/F12	Life Technologies, Karlsruhe
Harnstoff	BIOMOL, Hamburg
N,N'-Methylene-Bisacrylamid	Serva, Heidelberg
Strataclean	Stratagene, Heidelberg
TEMED	Serva, Heidelberg
Trypsin	Life Technologies, Karlsruhe
Trypton	Difco, über Becton Dickinson, Heidelberg
Triton X-100	Serva, Heidelberg

Alle anderen Chemikalien, soweit im Text nicht anders vermerkt, wurden von Merck (Darmstadt), Roth (Karlsruhe) oder Sigma (Deisenhofen) in der Qualität pro Analyse oder reinst bezogen. Das verwendete Wasser stammte aus der Reinstwasseranlage (Millipore, Eschborn) des Instituts für Medizinische Virologie, Gießen.

## 2.10 Geräte

Binokularmikroskop	Zeiss, Jena
CO <sub>2</sub> -Inkubator Steri-Cult 200	Labotect, Göttingen
Gelkammer	Protean™ (BioRad, München)
Gelkammer	„Tall-Mighty Small“-System 8 x 11cm (Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA)
Gelkamera CS1, Thermodrucker, Monitor	Cybertec, Berlin
Elektroblotkammer	Hoefer Scientific Instruments, San Francisco, USA
Laminar Flow-Arbeitsbank Lamin Air HB 2448	Heraeus, Osterode am Harz
Luminometer	Berthold, Wildbad
Massenspektrometer Vision 2000	(Finnegan MAT, Bremen)
Röntgenfilmentwickler Curix 60	AGFA, Mortsel, Belgien
Sequenzierapparatur (Baseace™ vertical Sequencer)	Stratagene, Heidelberg
Spannungsgerät Feathervolt	Stratagene, Heidelberg
Spektrophotometer DU-70	Beckmann, Palo Alto, USA
Szintillationszähler	Liquid scintillation counter, Wallac
Thermocycler Hybaid Omni Gene	MWG Biotech, Ebersberg
Thermocycler Hybaid PCR Express	MWG Biotech, Ebersberg
Vakuumbiotapparatur	VacuGene XL, Pharmacia, Freiburg
Ultrazentrifuge OPTIMA L-70K	Beckmann, USA
Zentrifuge Eppendorf 5417C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Eppendorf 5417R	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge CR 422	Jouan, Unterhachingen

## 2.11 Puffer, Lösungen und Medien

### 2.11.1 Klonierung

Äquilibrierungspuffer (pH 7,0)	750 mM	NaCl
	50 mM	MOPS
	15 %	Ethanol
	0,15 %	Triton X-100
Elutionspuffer	1,25 M	NaCl
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,5
	15 %	Ethanol
Lysispuffer	200 mM	NaOH
	1 %	SDS
Resuspensionspuffer	100 µg/ml	RNase A
	50 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA, pH 8,0
Waschpuffer	1,0 M	NaCl
	50 mM	MOPS, pH 7,0
	15 %	Ethanol
LB-Medium	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren.	
Für LB-Amp-Medium Zusatz von 200 µg/ml Ampicillin		
LB-Amp-Platten	10 g	Trypton
	5 g	Hefeextrakt
	10 g	NaCl
	20 g	Bakterienagar
Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O, autoklavieren, auf 55 °C abkühlen lassen.		
Nach Zusatz von 200 µg/ml Ampicillin auf Platten gießen.		

### 2.11.2 Ribonuklease Protection Assay (RPA)

Elutionspuffer: 0,5 M  $\text{NH}_4(\text{OAc})_2$   
1 mM EDTA  
0,2 % SDS

### 2.11.3 Kernextraktion

hypotonischer-Puffer 10 mM Hepes pH 7,9  
1,5 mM  $\text{MgCl}_2$   
10 mM KCl  
0,5 mM DTT stets frisch dazu geben

hypertonischer-Puffer 20 mM Hepes pH 7,6  
25 % (v/v) Glycerin  
0,42 M KCl  
1,5 mM  $\text{MgCl}_2$   
0,2 mM EDTA  
0,5 mM PMSF stets frisch dazu geben  
0,5 mM DTT

KCl-Lösung 100 mM

### 2.11.4 Gelretardationsanalyse (Electrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA))

30 % Acrylamidlösung 300 g Acrylamid  
8 g Bisacrylamid  
mit  $\text{H}_2\text{O}$  auf 1 l auffüllen

1x Bindungspuffer 10 mM Hepes pH 7,9  
60 mM KCl  
1 mM EDTA  
1 mM DTT  
400 mg 4 % Ficoll  
auffüllen auf 10 ml  $\text{dH}_2\text{O}$



Stopplösung	79 µl 0,1 M NaCl 5 mM EDTA pH 8,0 1 µl tRNS 10 mg/ml
-------------	--

4x Laemmli-Puffer	0,25 M Tris-HCL pH 6,8 12 % SDS 13 % Glycerin
-------------------	---

### 2.11.5 DNase I Footprint Analyse

Stopplösung	1 % SDS 20 mM EDTA 200 mM NaCl 250 µg tRNS/ml
-------------	--

40 % Acrylamid/Bisacrylamid	380 g Acrylamid 20 g Bisacrylamid mit H <sub>2</sub> O auf 1 l auffüllen
-----------------------------	--

Gelbindelösung	10 ml Ethanol (absolut) 330 µl 10 % Essigsäure 5 µl Bind-Silane
----------------	---

Repell-Silane	3 % Dichlormethylsilikon
---------------	--------------------------

Urea Gel Loading Puffer	8 M Harnstoff 20 mM EDTA 5 mM Tris-HCl pH 7,5 0,5 % (w/w) Bromphenoblau
-------------------------	--

**2.11.6 SDS-Gelelektrophorese**

10x Laufpuffer	0,25 M Tris-HCl pH 8,3 1,92 M Glycerin 1 % SDS
4x Trenngel	1,5 M Tris-HCl pH 8,8 0,1 % SDS
4x Sammelgelpuffer	0,5 M Tris-HCl pH 6,8 0,4 % SDS
4x Probenpuffer	0,25 M Tris-HCl pH 6,8 12 % SDS 13 % Glycerin 20 % DTT 1 % Bromphenolblau 20 % $\beta$ -Mercaptoethanol

**2.11.7 Coomassie-Färbung**

Coomassie-Lösung	0,5 g Brillant-Kresylblau 250 ml Methanol 50 ml Eisessig 200 ml H <sub>2</sub> O
Entfärber	5 % Eisessig 15 % Isopropanol

**2.11.8 Silber-Färbung**

Reducer	50 mg Citronensäure 0,7 ml 37 % Formalin in 1 l H <sub>2</sub> O
---------	--

## Silbernitratlösung:

Lösung A	1,55 g AgNO <sub>3</sub> in 8 ml H <sub>2</sub> O
Lösung B	38,2 ml H <sub>2</sub> O 3,8 ml NaOH 1 M 2,8 ml 25 % Ammoniak

Lösung A langsam in Lösung B einträufeln. Mit H<sub>2</sub>O auf 200 ml auffüllen.

**2.11.9 Sonstige Puffer und Lösungen**

6× Agarosegelprobenpuffer	60 ml	Glycerin
	0,1 g	Bromphenolblau
	ad 100 ml	TE-Puffer
DMSO-Mix	87,5 %	DMSO
	18 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , pH 7,0
	12 mM	SDS
Luziferin-Reaktionsgemisch	470 µM (14 mg)	Luziferin
	270 µM (20 mg)	Coenzym A
	530 µM (29 mg)	ATP
	33,3 mM (513 mg)	DTT
	0,1 mM (20 µl 0,5 M)	EDTA
	20 mM (358 mg)	Tricine
	1,07 mM (52 mg)	(MgCO <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> Mg(OH) <sub>2</sub> ×5H <sub>2</sub> O
	2,67 mM (65 mg)	MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O

Ad 100 ml ddH<sub>2</sub>O auffüllen und auf pH 7,8 einstellen.

PBS (pH 7,4)	137 mM	NaCl
	2,7 mM	KCl
	8,1 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> × 2 H <sub>2</sub> O
	1,8 mM	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>

RNS- Probenpuffer	50 % (v/v)	Glyzerin
	10 mM	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	0,4 % (w/v)	Bromphenolblau

20× SSC	3 M	NaCl
	0,3 M	Na <sub>3</sub> -Citrat

Mit NaOH auf pH 7,0 einstellen und autoklavieren.

20 % SDS	100 g	SDS
----------	-------	-----

Mit dH<sub>2</sub>O auf 500 ml auffüllen und unter Rühren bei 68 °C lösen.

TAE-Puffer	40 mM	Tris-Acetat
	1 mM	EDTA, pH 8,0

10x TBE	54 g	Tris
	27,5 g	Borsäure
	20 ml	0,5 M EDTA, pH 8,0
	mit H <sub>2</sub> O auf 500 ml auffüllen	

TE	10 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	1 mM	EDTA, pH 8,0

Transfer-Puffer	28,8 g Glycin	
	6,0 g Tris	
	300 ml Methanol	
	1700 ml dH <sub>2</sub> O	

## 2.12 Radionukleotide

Radioaktiv markierte Nukleotide ( $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP) wurden von der Firma Amersham, Braunschweig bezogen.

## **3 Methoden**

### **3.1 Methoden zur Zellkultur**

Alle Arbeiten mit eukaryonten Zellen wurden unter sterilen Bedingungen an einer Laminar Flow Arbeitsbank durchgeführt. Die Zellmedien und Puffer wurden mit Wasser aus der Reinstwasseranlage der Firma Millipore (Eschborn) angesetzt und sterilfiltriert oder autoklaviert.

#### **3.1.1 Kultivieren animaler Zellen**

Alle Zellen wurden aliquotiert in flüssigem Stickstoff bei  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  in Kryoröhrchen (Nalgene, Hamburg) gelagert. Zur Anzucht wurden die Zellen mit vorgewärmtem HAMS/F12 mit 10 % FKS aufgetaut. Um das im Einfriermedium enthaltene zellschädigende DMSO zu entfernen, wurden die Zellen für 5 Min. bei 1200 Upm und  $4^{\circ}\text{C}$  pelletiert (Jouan-Zentrifuge CR422). Anschließend wurde das Einfriermedium abgesaugt, die Zellen in HAMS/F12 mit 10 % FKS resuspendiert und auf eine Zellkulturschale ausplattiert. Die weitere Kultivierung erfolgte auf 100 mm und 150 mm Zellkulturschalen sowie 6-Loch-Platten (Becton Dickinson, Heidelberg) in jeweils 10 ml, 30 ml und 4 ml HAMS/F12/10 % FKS in einem Brutschrank bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 6 %  $\text{CO}_2$ .

Das Medium wurde in der Regel alle 2-3 Tage gewechselt. Nach Erreichen der Konfluenz wurde das alte Medium von den Zellen abgesaugt, einmal mit sterilem PBS gewaschen und 5-10 Min. mit einer 10 % Trypsinlösung in PBS im Brutschrank inkubiert. Die Enzymlösung wurde abgesaugt und die Zellen mit 10 ml HAMS/F12/10 % FKS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde nun im Verhältnis 1:3 auf neue Zellkulturschalen verteilt und das fehlende Medium ergänzt.

Zur Konservierung in flüssigem Stickstoff wurden die Zellen wie oben beschrieben von einer 150 mm Zellkulturschale abtrypsiniert, in 6 ml Einfriermedium (HAMS/F12, 20 % FKS und 10 % DMSO) aufgenommen und in Kryoröhrchen bei  $-170\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.1.2 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden die Zellen wie oben beschrieben von einer Zellkulturschale abtrypsiniert und in ein 50 ml Falcon-Röhrchen überführt. Um die Zellen besser zählen zu können, wurden diese durch eine sterile 10 ml Spritze mit

einer Kanüle (18G11/2, 1,2 x 40 T.W P.W) gezogen und somit vereinzelt. Die Zellsuspension wurde sorgfältig gemischt und ein Tropfen hiervon auf das Zählfeld einer NEUBAUER-Zählkammer gegeben. Das Zählfeld wurde mit einem Deckgläschen abgedeckt und (10 Quadrate) ausgezählt. Die ermittelte Zellzahl wurde auf 25 Quadrate umgerechnet. Dieser Wert entspricht, multipliziert mit  $10^4$ , der Zellzahl/ml.

### 3.1.3 Transfektion mit Lipofectamine™

Lipofectamine™ (Life Technologies, Karlsruhe) besteht aus einem polykationischen Lipid und einem neutralen Lipid im Verhältnis 3:1 (w/w) in  $H_2O$ . Dieses Gemisch bildet Liposomen aus, die sich mit DNS zu stabilen Komplexen zusammenlagern und diese durch Fusion mit der Zellmembran in das Zellinnere befördern können.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf 6-Loch Platten, auf die am Tag zuvor  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausplattiert wurden.

Zunächst wurde die zu transfizierende Plasmid DNS mit 100  $\mu$ l serumfreiem HAMS/F12 Medium gemischt. Die jeweilige Menge Lipofectamine™ (5  $\mu$ l/ $\mu$ g DNS) wurde mit serumfreiem HAMS/F12 Medium auf 100  $\mu$ l aufgefüllt und anschließend mit der DNS für 30 Min. bei RT inkubiert. Während dieser Zeit wurden die Zellen einmal mit PBS gewaschen und anschließend mit 4 ml serumfreiem HAMS/F12 Medium versehen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Lipofectamine™/DNS-Gemisch auf die Zellen gegeben. Nach 4 Stunden Inkubation im Brutschrank wurde das Medium durch HAMS/F12 mit 10 % FKS ersetzt.

### 3.1.4 Transfektion mit SuperFect™

Bei dem Reagenz SuperFect™ handelt es sich um ein aktiviertes Dendrimer. An einem zentralen Kern sind radiale Zweige angeordnet, deren Enden aus geladenen Aminogruppen bestehen. Zusammen mit DNS-Molekülen bildet SuperFect™ eine kompakte Vernetzung positiver Ladung aus. Diese Ladung ermöglicht eine Bindung an negativ geladene Rezeptormoleküle auf der Zelloberfläche und erleichtert einen Eintritt in die Zelle. Im Zellinneren kommt es zu einer Fusion mit Endosomen. Hierbei inhibiert SuperFect™ den enzymatischen Abbau des SuperFect™/DNS-Komplexes durch lysosomale Nukleasen.

Die folgenden Angaben beziehen sich auf 6-Loch Platten, auf die am Tag zuvor  $2 \times 10^5$  Zellen pro Loch ausplattiert wurden.

Als Transfektionsansatz wurde die zu transfizierende Plasmid DNS in 100 µl serumfreiem HAMS/F12 Medium aufgenommen und nach Zugabe des SuperFect™-Reagenz (5 µl SuperFect™/µg DNS) für 10 Minuten bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Medium von den Zellen abgenommen und diese 1x mit PBS gewaschen. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Komplexbildung des Transfektionsansatzes durch die Zugabe von 600 µl serumhaltigem HAMS/F12/10 % FKS Medium gestoppt und der Ansatz auf die HepG2 Zellen gegeben. Die Zellen wurden für 2,5 Stunden bei 37 °C inkubiert, 2x mit PBS gewaschen und mit 3 ml HAMS/F12/10 % FKS versehen.

### **3.2 Methoden zur Proteinanalyse**

#### **3.2.1 Zellyse mit Reporter Gen Assay Lysis Puffer (Boehringer, Mannheim)**

Der Puffer wurde in 5x konzentrierter Form geliefert und vor Gebrauch mit ddH<sub>2</sub>O auf 1x verdünnt. Die transfizierten Zellen wurden 3x mit jeweils 5 ml kaltem PBS gewaschen und anschließend mit 1 ml Lysis Puffer (Boehringer, Mannheim) 30 Minuten bei RT inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und eventuell vorhandene Zelltrümmer durch Zentrifugation (14000 Upm, 5 Min., Eppendorf 5417 C) pelletiert. Teile des Zellysats wurden zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einen BCA-Assay eingesetzt.

#### **3.2.2 BCA-Proteinbestimmung**

Die BCA-Proteinbestimmung (Pierce, über KMF, St. Augustin) dient zur spektrophotometrischen Quantifizierung der im Zellysat enthaltenen zytosolischen Proteine. Das Testprinzip beruht auf der Biuret-Reaktion, bei der Proteine in alkalischem Milieu Cu<sup>2+</sup>- zu Cu<sup>1+</sup>-Ionen reduzieren. Zwei Moleküle des dabei verwendeten Reagenz BCA (bicinchoninic acid) bilden mit Cu<sup>1+</sup>-Ionen einen violetten Komplex, welcher wasserlöslich ist und eine starke Absorption bei einer Wellenlänge von 562 nm zeigt.

Der Proteinassay wurde in Mikrotiterplatten durchgeführt. Hierzu wurden jeweils 10 µl des Zellysats im Doppelansatz pipettiert. Für die Erstellung einer Eichkurve zur späteren Berechnung der Proteinkonzentrationen wurde der im Test mitgeführte BSA-Standard (2 µg/µl, Pierce, über KMF, St. Augustin) in verschiedenen Konzentrationen eingesetzt.

Standard und Proben wurden mit je 200 µl BCA-Arbeitslösung (1 Teil Lösung B auf 50 Teile Lösung A) für 30 Min. bei 37 °C inkubiert. Die photometrische Auswertung erfolgte bei 550 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm.

### 3.2.3 CAT-Assay

Dieser Assay wurde mit einem kommerziell erhältlichen CAT-ELISA (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. Der CAT-Assay dient dem quantitativen Nachweis der in Zellen gebildeten Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT). Dazu werden diese transient mit einem Reportergenkonstrukt transfiziert, welches den Leserahmen für das CAT-Gen enthält. Steht der Leserahmen unter der Kontrolle eines zu untersuchenden Promotor/Enhancer-Elements, so läßt sich anhand der Menge des gebildeten CAT der Einfluß verschiedener Faktoren (z.B. Transkriptionsfaktoren) auf die Genexpression untersuchen.

Der Test beruht auf dem Sandwich-Enzym-Immunoassay-Prinzip. Die Oberfläche der Mikrotitermodule ist vom Hersteller mit einem polyklonalen Antikörper gegen das CAT-Protein beschichtet. Das in den Zellysaten enthaltene CAT bindet spezifisch an die Festphase-gebundenen Anti-CAT-Antikörper. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Lysatanteile wird ein zweiter, Digoxigenin-markierter polyklonaler Anti-CAT-Antikörper hinzugegeben, der an das gebundene CAT bindet. Nach dem Auswaschen der ungebundenen Anteile dieses Antikörpers kann der gebundene Anteil durch einen Anti-DIG-Antikörper, der Peroxidase-markiert ist, erkannt werden. Der Nachweis des Antikörper-Enzym-Komplexes erfolgt über den Umsatz des Substrates ABTS<sup>®</sup> bzw. BM blue (Boehringer, Mannheim) durch die gebundene Peroxidase. Dies führt zu einem farbigen Produkt, dessen Extinktion sich im Photometer bei einer Wellenlänge von 405 nm und einer Referenzwellenlänge von 492 nm messen läßt.

Der CAT-ELISA wurde nach Angaben des Herstellers (Boehringer, Mannheim) durchgeführt. In den Versuchen wurden Proteinmengen von 50-100 µg eingesetzt. Um den Versuch auszuwerten, wurde parallel eine Reihe CAT-Protein-Standards nach Angaben des Herstellers (0,125 ng/ml, 0,25 ng/ml, 0,5 ng/ml und 1 ng/ml) mitgemessen. Das Reaktionsvolumen betrug 200 µl und es wurden jeweils Doppelansätze eingesetzt.



### 3.2.4 Luziferase-Assay

Der Luziferase-Assay erlaubt eine quantitative Analyse von Faktoren, die die Genexpression eukaryontischer Zellen beeinflussen. Dazu werden die Zellen transient mit einem Reportergenkonstrukt transfiziert, welches für das Luziferasegen des Leuchtkäfers *Photinus pyralis* kodiert (de Wet et al., 1987). Dieses Enzym katalysiert die ATP-abhängige Oxidierung des Substrats Luziferin, wodurch dieses aktiviert wird und Licht mit einem Emissionsmaximum bei 562 nm ausstrahlt. Da die Expression des Luziferasegens von vorgeschalteten Promotor/Enhancer-Elementen kontrolliert wird, ist die gemessene Enzymaktivität ein direktes Maß für die Beeinflussung der Transkriptionsrate dieser Elemente durch zu untersuchende Faktoren wie z.B. Proteine aus kotransfizierten Expressionsvektoren.

Wie bereits beschrieben (Kapitel 3.1.1), wurden am Tag vor der Transfektion  $2 \times 10^5$  HepG2 Zellen pro Napf einer 6-Loch Platte ausplattiert und über Nacht im Brutschrank gehalten.

Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 1 µg des Luziferasevektors (pGL2 control) als Positivkontrolle und mit 1 µg Expressionsvektor des zu untersuchenden Promotor/Enhancer-Elements durch Lipofectamine™ (Kapitel 3.1.3) bzw. SuperFect™ (Kapitel 3.1.4) transfiziert und 2 Tage später lysiert (Kapitel 3.2.1).

Die im Zellysat enthaltenen zytosolischen Proteine wurden mittels des BCA-Assays (Kapitel 3.2.2) quantifiziert. Für den Luziferase-Assay wurden gleiche Proteinmengen (5–10 µg) pipettiert, mit Tris-HCl auf 50 µl aufgefüllt und im Luminometer ((Lumat LB9501, Berthold, Wildbad) zur Verfügung gestellt vom Institut für Mikrobiologie und Molekularbiologie, Gießen) unter automatischer Zugabe des Luziferin-Reaktionsgemisches gemessen.

## 3.3 Methoden zur RNS-Analyse

### 3.3.1 RNS-Extraktion aus eukaryonten Zellen

Zelluläre Gesamt-RNS wurde mit dem Trizol-Reagenz (Life Technologies, Karlsruhe) oder dem RNeasy Kit (Qiagen, Hilden) nach Angaben des Herstellers extrahiert und in H<sub>2</sub>O/DEPC aufgenommen. Ihre Konzentration wurde mit dem Photometer bestimmt (Kapitel 3.4.4). Alle Lösungen zur RNS-Analyse wurden zur Inaktivierung von RNasen mit Aqua bidest, das zuvor mit Diethylpyrocarbonat (DEPC) behandelt worden war, hergestellt. Dazu wurde ein Volumenpromille DEPC zugesetzt und über

Nacht bei 37 °C inkubiert. Das noch vorhandene DEPC wurde durch zweimaliges Autoklavieren abgedampft.

### 3.3.2 Herstellung einer <sup>32</sup>P-markierten DNS-Sonde

Zum Nachweis spezifischer RNS-Banden wurde eine radioaktiv markierte DNS-Sonde eingesetzt, die mit dem Rediprime-Kit (Amersham, Braunschweig) nach der „random prime“-Methode (Feinberg and Vogelstein, 1983) hergestellt wurde. Dabei lagern sich Hexanukleotide mit zufälliger Sequenz an denaturierte DNS an und dienen dort als Startmoleküle (Primer) für die Synthese des zweiten komplementären DNS-Stranges. Diese erfolgt durch das „Klenow-Fragment“ einer DNS-Polymerase aus *E.coli*, welches im Gegensatz zum Holoenzym keine 5'-3'-Exonukleaseaktivität aufweist, die eingebaute Nukleotide als Monophosphate abspalten würde. Da unter den Nukleotiden des Reaktionsansatzes auch ein radioaktiv markiertes Nukleotid angeboten wird, kommt es unter Einbau der Nukleotide zu einer <sup>32</sup>P-Markierung des neu synthetisierten DNS-Stranges.

Es wurden 25–50 ng eines Plasmid-Fragments, das zuvor durch Restriktionsverdau, Auftrennung über ein Agarosegel und Aufreinigung mittels Nucleotrap (Macherey-Nagel, Düren) gewonnen worden war, in 50 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen. Die DNS wurde durch 5-minütiges Kochen denaturiert, zu dem Labelingmix des Rediprime-Kits gegeben und gemischt bis eine Färbung auftrat. Anschließend wurden 5 µl (50 µCi) <sup>32</sup>P-dCTP hinzupipettiert und gemischt. Es folgte eine Inkubation von 45 Minuten. Die freien Nukleotide wurden über eine Gelfiltrationssäule (Quick Spin Column Sephadex G 50, Boehringer, Mannheim) abgetrennt und die Einbaurate durch Messung von 1 µl Eluat im Szintillationszähler (Liquid scintillation counter, Wallac) bestimmt.

### 3.3.3 Northern-Blot

Diese Methode erlaubt den spezifischen Nachweis von denaturierter RNS, die nach Auftrennung in einem Agarosegel und Transfer auf eine positiv geladene Nylonmembran mittels radioaktiv markierter Sonden nachgewiesen werden kann (Thomas, 1980).

10 µg der mit Trizol (Life Technologies, Karlsruhe) extrahierten zellulären RNS wurden für 30 Min. bei 37°C mit 4 U RNase-freier DNase I (Boehringer, Mannheim) in 10 mM MgSO<sub>4</sub>-Lösung zur Entfernung von störender DNS verdaut. Die

Denaturierung der RNS erfolgte durch Zugabe von 4,5 µl 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 6,6 µl 6 M Glyoxal und 22,5 µl DMSO und Inkubation bei 55 °C für 45 Min. Anschließend wurden die Proben kurz auf Eis gestellt, mit 6× RNS-Probenpuffer versetzt und zur Auftrennung auf ein horizontales Agarosegel (1 % Agarose in 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) aufgetragen. Die Gelkammer war vorher zur Inaktivierung eventuell vorhandener RNasen mit 50 mM NaOH ausgespült worden. Das Einlaufen der Proben in das Gel erfolgte bei 19 mA, die weitere Elektrophorese wurde bei 25-50 mA durchgeführt. Der Laufpuffer wurde während der Elektrophorese ständig rezirkuliert, um eine zu starke Verschiebung des Puffers-pHs zu verhindern, die die RNS-Glyoxylierung hätte destabilisieren können. Anschließend wurde das Gel 20 Min. im Ethidiumbromidbad gefärbt und unter UV-Beleuchtung fotografiert, um sowohl das Auftragen gleicher RNS-Mengen zu kontrollieren, sowie anhand der Marker-RNS (18S und 28S, Boehringer, Mannheim) die Laufgröße der RNS zu bestimmen.

Die Übertragung der RNS auf eine Nylonmembran (Qiabraner Nylon Plus, Qiagen, Hilden) erfolgte nun durch das Anlegen eines Vakuums an Agarosegel und Membran. Dazu wurden Blotkammer (VacuGene XL, Pharmacia, Freiburg) und Membran mit Transferpuffer (20× SSC) befeuchtet, das Gel auf die Nylonmembran gelegt und ein Vakuum von 50 – 55 mbar für 30 Min. angelegt. Anschließend wurde die Membran kurz mit Transferpuffer gewaschen und die RNS durch UV-Strahlen (UV-Stratalinker, Stratagene, Heidelberg) fixiert. Der Blot wurde mit Methylblau (Stratagene, Heidelberg) für 5 – 10 Min. gefärbt und dreimal mit 2× SSC/0,1 % SDS gewaschen, um die Position der 18S bzw. 28S RNS zu markieren.

Nun wurde der Blot zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen mit dem Rapid-hyb Puffer (Amersham, Braunschweig) in einer Hybridisierungs-Glasröhre für 30 Min. bei 70 °C unter Drehen prähybridisiert. Anschließend erfolgte die Zugabe der radioaktiv markierten Sonde (mit einer Aktivität von 200 000 counts/cm<sup>2</sup> Blot), die zuvor für 2 Min. bei 100 °C denaturiert und kurz auf Eis gekühlt worden war, und eine Hybridisierung bei 70 °C für 1-2,5 Stunden. Zum Nachweis der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS diente ein 480 bp langes p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Amplifikat der Maus, welches mittels RT-PCR (Kapitel 3.3.5) unter Verwendung der Primer rat-waf-as und rat-waf-s aus aufgereinigter mRNA aus AML12 Zellen amplifiziert wurde. Nach der Aufreinigung (Kapitel 3.5.1) wurde das Fragment wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben mit <sup>32</sup>P-dCTP markiert.

Nach der Hybridisierung wurde die Membran zur Entfernung nicht gebundener Nukleinsäuren erst 20 Min. mit  $2\times$  SSC/0,1 % SDS bei RT und dann zweimal 15 Min. bei 65 °C mit  $1\times$  SSC/0,1 % SDS gewaschen. Die Membran wurde eingeschweißt und auf eine mit Europium beschichtete Lumineszenzfolie gelegt. Die Auswertung erfolgte an einem Phosphorimager (Bioimager Raytest, Straubenhardt) mit Hilfe des Computerprogramms TINA (Raytest, Straubenhardt).

### 3.3.4 Ribonuclease Protection Assay

Der Ribonuclease Protection Assay (RPA) dient der Identifikation und Quantifizierung von RNS (meist messenger-RNS) in einem Gemisch aus zellulärer Gesamt-RNS. Er ist im Vergleich zum Northern-Blot wesentlich empfindlicher und erlaubt den Nachweis geringer RNS Mengen.

Für den RPA wird eine markierte RNS-Sonde synthetisiert, welche komplementär zu der zu analysierenden RNS ist. Hierzu wird dieses Fragment in einen geeigneten Vektor, indem das klonierte Fragment unter der Kontrolle eines Bakteriophagen Promotors (T7, Sp6) steht, kloniert. Durch die Verwendung der entsprechenden Polymerase (T7- bzw. Sp6-Polymerase) wird so eine für die Ziel-RNS spezifische RNS-Sonde transkribiert. Die markierte RNS-Sonde wird dann mit der Probe inkubiert und nach der Hybridisierung mit Ribonuklease behandelt. Während die mit der markierten Sonde hybridisierte RNS vor einer Degradation geschützt bleibt, wird die einzelsträngige, nicht hybridisierte RNS verdaut. Die geschützte RNS wird anschließend auf einem Polyacrylamidgel separiert und mittels Autoradiographie sichtbar gemacht.

#### 3.3.4.1 *In vitro* Transkription der RNS-Sonde (MAXIsript™, Ambion)

Als Sonde wurde humane  $p21^{waf/cip/sdi}$ -RNS genommen. Hierzu wurde der Vektor pCMVsdi mit den Restriktionsenzymen *SpeI* (glatte Enden) und *StuI* (überhängende Enden) geschnitten und wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben aufgereinigt. Anschließend wurde das Fragment in sense Orientierung in den zuvor mit *EcoRV* (glatte Enden) und *XbaI* (überhängende Enden) geschnittenen Vektor pcDNA3 kloniert. Die Klonierung wurde durch Sequenzierung überprüft. Für den Nachweis von mRNS ist es wichtig, daß die synthetisierte komplementäre RNS-Sonde eine antisense Orientierung aufweist. Hierzu wird die Plasmid DNS zunächst mit einem Restriktionsenzym linearisiert, welches in der Multiplen Klonierungs Site am

aminoterminalen Ende der proteincodierenden Region schneidet. Für die spätere Transkription wird der Phagenpromotor am carboxyterminalen Ende verwendet. Nach dem Restriktionsverdau wird die Plasmid DNS über ein Agarosegel (Kapitel 3.5.1) aufgereinigt. Das isolierte Template wird mit Proteinase K verdaut (Kapitel 3.5.6) und mit Phenol/Chloroform (Kapitel 3.5.7) extrahiert. Anschließend wird die DNS-Konzentration im Photometer (Kapitel 3.4.4) bestimmt.

Für einen Transkriptionsansatz wurden zwischen 0,5-1 µg Template eingesetzt. Folgende Mengen wurden in ein 1,5 ml safe-Lock Reaktionsgefäß pipettiert:

1 µg DNS Template

2 µl 10x Transkriptions Puffer (Ambion, Austin, Texas)

je 1 µl ATP, CTP, GTP, TTP (10 mM)

2 µl T7 Polymerase

mit nukleasefreiem H<sub>2</sub>O auf 20 µl aufgefüllt

Anschließend wurde für 1 Std. bei 37 °C inkubiert.

Um das Template zu entfernen, wurde nun für 2 Min. auf 95 °C erhitzt, kurz auf Eis abgekühlt und mit 1 µl RNase freier DNase I (2 U/µl) für 15 Min. bei 37 °C verdaut. Die Probe wurde über Nacht bei -70 °C weggefroren.

### **3.3.4.2 Reinigung der RNS-Sonde**

Zum Entfernen der freien Nukleotide wurde die Sonde nun über ein 5 %-iges Acrylamid/ 8 M Harnstoff Gel aufgereinigt.

Gelansatz (Kleine Kammer 13 cm x 15 cm x 0,75 mm):

7,2 g Harnstoff

1,5 ml 10x TBE

1,875 ml 40 % Acrylamid (Acrylamid: Bisacrylamid = 19: 1)

auf 15 ml mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

Zum vollständigen Lösen des Harnstoffes wurde auf max. 50 °C erhitzt.

120 µl 10 % Ammoniumpersulfat in H<sub>2</sub>O

16 µl TEMED

Die Probe wurde nach dem Auftauen auf Eis mit einem gleichen Volumen Gel Loading Buffer gemischt und auf das Gel aufgetragen. Als Laufpuffer wurde 1x TBE verwendet. Die Elektrophorese fand bei 150–200 V für ca. 1 Std. statt.

Anschließend wurde das Gel auf eine DC-Fertigplatte (Dünnschicht-Chromatographie–Fertigplatten, Kieselgel 60 (ohne Fluoreszenzindikator), Merck

Darmstadt) gelegt und die Bande mit UV-Licht einer Wellenlänge von 254 nm sichtbar gemacht (rosa Farbe). Die Bande wurde ausgeschnitten und nach dem Überführen in ein Reaktionsgefäß mit 200 µl Elutionspuffer (0,5 M  $\text{NH}_4(\text{OAc})_2$ /1mM EDTA/0,2 % SDS) versetzt. Es wurde über Nacht bei RT inkubiert. Am nächsten Tag wurde die RNS mit Ethanol gefällt (Kapitel 3.5.8) und anschließend in 20 µl nukleasefreiem  $\text{H}_2\text{O}$  aufgenommen. Die RNS-Konzentration wurde im Photometer bestimmt (Kapitel 3.4.4).

#### **3.3.4.3 Herstellung einer nicht radioaktiven RNS-Sonde (BrightStar™ Psoralen-Biotin, Ambion)**

Psoralen ist eine trizyklische planare Verbindung und hat die Eigenschaft, ähnlich wie Ethidiumbromid zwischen die Basen von Nukleinsäure zu interkalieren. Durch eine Bestrahlung mit UV-Licht einer Wellenlänge von 365 nm wird es kovalent an diese gebunden. Das BrightStar™ Psoralen–Biotin Kit nutzt diese Eigenschaft, um Nukleinsäure mit Biotin zu markieren. Hierzu wird ein Konjugat aus Psoralen–Biotin mit der zu markierenden Nukleinsäure gemischt und auf Eis für 45 Min. bei 365 nm inkubiert. Anschließend wird das überschüssige Psoralen-Biotin durch eine mehrfache Extraktion mit  $\text{H}_2\text{O}$  gesättigtem Butanol und einer anschließenden Zentrifugation für 1 Min. bei 7000 g entfernt. Die markierte Sonde wird bei  $-70^\circ\text{C}$  weggefroren.

Für einen Markierungsansatz wurden jeweils zwischen 0,5–2 µg gereinigter RNS eingesetzt.

#### **3.3.4.4 RPA (HybSpeed™ RPA, Ambion)**

Laut dem mitgelieferten Protokoll wurden pro Ansatz 200-800 pg der markierten Sonde und 20 µg der mit Trizol (Kapitel 3.3.1) aufgearbeiteten zellulären mRNS eingesetzt. Hierzu wurde die mRNS mit Hefe-RNS auf 50 µg aufgestockt. Die Proben wurden in 0,5 ml safe-Lock Reaktionsgefäßen angesetzt und auf ein maximales Volumen von 20 µl mit  $\text{dH}_2\text{O}$  aufgefüllt. Anschließend wurde mit Ethanol und 0,5 M  $\text{NH}_4\text{OAc}$  kopräzipitiert. Die RNS wurde in 10 µl Hybridization Puffer ( $95^\circ\text{C}$ ) aufgenommen und durch mehrmaliges Vortexen bei  $95^\circ\text{C}$  gelöst. Abschließend wurde für 10 Min. bei  $68^\circ\text{C}$  inkubiert. Nun erfolgte die Zugabe von 100 µl des zuvor mit RnaseA/T1 Mix versehenen HybSpeed RNase Digestion Puffers (1:100). Die Proben wurden für 30 Min. bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert und die Reaktion mit 150 µl HybSpeed

Inactivation/Precipitation Mix gestoppt. Die Proben wurden für 15 Min. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  tiefgefroren und anschließend für 15 Min. bei 14000 Upm und  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert und das Pellet in  $10\text{ }\mu\text{l}$  Gel Loading Buffer II aufgenommen. Die Proben wurden auf einem 5 % Polyacrylamid/8 M Harnstoff Gel (Kapitel 3.3.6), mit 1x TBE als Laufpuffer und 200 V für 1 Std. aufgetrennt. Anschließend wurden die RNS Fragmente mittels Elektrophoretischer Transfer (Blot-Kammer, Hoefer) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Amersham, Braunschweig) transferiert. Geblottet wurde mit 0,5x TBE für 1 Std. bei 200 mA. Danach wurde die RNS durch UV-Bestrahlung (UV-Stratalinker, Stratagene, Heidelberg) fixiert. Die Membran wurde anschließend 2x 5 Min. mit 1x Wasch Puffer (Ambion, Austin, Texas) gewaschen, in Folie eingeschweißt und bei  $4^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### **3.3.4.5 Nicht radioaktiver Nachweis von RPA Produkten (BrightStar™ BioDetect™, Ambion)**

Hierbei wurde nach verschiedenen Waschschritten und dem Absättigen der Membran mit den im Kit enthaltenen Lösungen ein Konjugat aus Streptavidin und einer alkalischen Phosphatase an die biotin-markierte RNS gebunden. Durch die Zugabe des Substrats CPD-Star® kommt es zu einer chemischen Reaktion. Die hierbei frei werdenden Photonen belichten den aufgelegten Röntgenfilm. Anschließend wurde der Film entwickelt.

#### **3.3.5 RT-PCR**

Zur Klonierung zellulärer Gene wurde eine RT-PCR eingesetzt. Hierbei wurde die extrahierte RNS durch eine Reverse Transkriptase in cDNS umgeschrieben und mittels PCR amplifiziert, so daß eine Auswertung im Agarosegel und eine anschließende Klonierung in einen Expressionsvektor möglich war.

Gesamt-RNS wurde mit dem Trizol-Reagenz (Life Technologies, Karlsruhe) aus Zellen extrahiert,  $2\mu\text{g}$  RNS mit RNase-freier DNase I (Boehringer, Mannheim) in  $10\text{ mM}$   $\text{MgSO}_4$ -Lösung für 45 Min. bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  zur Entfernung von störender DNS verdaut und dann die DNase I durch Erhitzen auf  $68\text{ }^{\circ}\text{C}$  (15 Min.) inaktiviert. Für die reverse Transkription wurde  $1\text{ }\mu\text{g}$  der DNase I verdauten RNS ( $9\text{ }\mu\text{l}$ ) mit  $1\text{ }\mu\text{l}$  Primer ( $10\text{ mM}$ ) versetzt und mit Mineralöl überschichtet. Sodann wurde die Lösung für 2 Min. auf  $90\text{ }^{\circ}\text{C}$  erhitzt, 2 Min. bei der für den Primer spezifischen Anlagerungstemperatur inkubiert und auf Eis gestellt. Dort erfolgte die Zugabe des vorher auf Eis erstellten RT-Gemischs:

4 µl 5× Superscript I First Strand-Puffer (Life Technologies, Karlsruhe)

2 µl DTT (0,1 M, Life Technologies, Karlsruhe)

2 µl dNTP-Mix (10 mM, Pharmacia, Freiburg)

1 µl RNase Inhibitor (RNAguard, ca. 39 U/µl, Pharmacia, Freiburg)

1 µl Reverse Transkriptase (Superscript I, Life Technologies, Karlsruhe)

Nach gründlichem Mischen erfolgte die reverse Transkription für 90 Min. bei 42 °C und wurde durch 5 minütiges Erhitzen auf 95 °C gestoppt. Sodann wurden 5 µl der revers transkribierten RNS in eine PCR eingesetzt.

### **3.4 Methoden zur DNS-Analyse**

#### **3.4.1 Restriktionsverdau von DNS-Fragmenten**

Restriktionsenzyme kommen sowohl präparativ bei der Herstellung von Plasmiden als auch analytisch zur Überprüfung von DNS-Fragmenten auf ihre Sequenz und Ausrichtung, z.B. in einem Plasmid, zum Einsatz. Zur Behandlung der DNS mit Restriktionsenzymen wurden pro 1 µg DNS 2–3 U einer Restriktionsendonuklease, die bei –20 °C in 50 % Glycerin gelagert wurde, eingesetzt. Die Reaktion erfolgte in dem von der Herstellerfirma mitgelieferten 10-fach Puffer bei der jeweiligen optimalen Arbeitstemperatur des Enzyms (i.A. 37 °C) für mehrere Stunden oder über Nacht je nach Haltbarkeit des Enzyms. Manchen Reaktionen wurde nach Angaben des Herstellers noch bovines Serumalbumin (BSA) in einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugefügt.

#### **3.4.2 Agarosegelelektrophorese**

Die Auftrennung von DNS-Fragmenten fand in Agarosegelen mit 0,7 % bis 2 % Agarose (w/v) statt. Dazu wurde die Agarose in 20–50 ml 1x TAE in der Mikrowelle aufgekocht, 1 µl Ethidiumbromidlösung (10 mg/ml) pro Gel zugegeben und nach kurzem Abkühlen auf die Gelschlitten einer horizontalen Elektrophoresekammer gegossen. Die Proben wurden mit 1/6 Volumen 6×Ladepuffer in die durch einen Teflonkamm ausgesparten Taschen aufgetragen und bei 90-110 V in TAE-Puffer aufgetrennt. Für eine Größenbestimmung der DNS-Banden wurde außerdem ein DNS-Längenstandard aufgetragen.

Zur Auswertung wurden die Gele auf einen Transilluminator (Cybertec, Berlin) gelegt und mit UV-Licht (302 nm) bestrahlt. Aufgrund der fluoreszierenden Eigenschaften



des in der DNS interkalierenden Ethidiumbromids konnten so die DNS-Banden dargestellt, mit einer computergesteuerten Kamera (Gelkamera CS1, Cybertec) aufgenommen und mittels eines angeschlossenen Thermodruckers dokumentiert werden.

### 3.4.3 Polymerase Ketten Reaktion

Die PCR (Polymerase Chain Reaction, modifiziert nach (Mullis, 1987)) ist eine Methode zur Vervielfältigung von DNS-Fragmenten. Die Ausgangs-DNS (Template) wird im ersten Schritt denaturiert, in einem zweiten Schritt erfolgt die Anlagerung zweier spezifischer Primer (sense- und antisense-Orientierung), zwischen denen sich die zu amplifizierende Sequenz befindet, an die nun einzelsträngige DNS. Die Primer werden dann in einem dritten Schritt durch eine thermostabile Polymerase verlängert. Die einzelnen Schritte sind durch unterschiedliche Reaktionstemperaturen gekennzeichnet. In den weiteren Reaktionszyklen wird diese Abfolge beibehalten, und da dabei immer die zuvor synthetisierten DNS-Stränge zusätzlich als Matrizen dienen, erfolgt eine exponentielle Vermehrung des betreffenden DNS-Fragments.

In einem Reaktionsansatz für die PCR waren enthalten:

10x PCR-Puffer (Endkonzentration: 1x)

MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM)

Sense-Primer (0,1 µM)

Antisense-Primer (0,1 µM)

dNTP-Mix (0,1 mM)

Polymerase (50 U/ml)

Template-DNS

H<sub>2</sub>O zum Auffüllen auf 50 bzw. 100 µl

Taq-Polymerase, 10x PCR-Puffer und MgCl<sub>2</sub> wurden von Perkin Elmer (Überlingen), der dNTP-Mix von Pharmacia (Freiburg) bezogen.

Bei der Amplifikation von DNS für eine anschließende Klonierung wurde die *Pfu*-Polymerase (aus *Pyrococcus furiosus*, Stratagene, Heidelberg) verwendet. Sie weist eine größere Replikationsgenauigkeit auf und ist thermostabiler (Lundberg et al., 1991).

Nach Überschichtung des Reaktionsansatzes mit einem Tropfen Mineralöl wurde die PCR mit einem Thermocycler ausgeführt. Ein typisches Programm mit 30 Zyklen sah wie folgt aus:

1 Min.        95 °C (Denaturierung)

1 Min.        53 °C (Anlagerung)

1 Min.        72 °C (Verlängerung)

Nach Beendigung der PCR wurden je 10 µl in einer Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und so ausgewertet.

#### **3.4.4 Bestimmung der Nukleinsäure Konzentration im Photometer**

Zur photometrischen Konzentrationsbestimmung wurde 1 µl der Probe mit H<sub>2</sub>O auf 100 µl aufgefüllt. Die Extinktionsmessung erfolgte bei 260 nm und mit einer Referenzwellenlänge von 280 nm, dem Absorptionsmaximum zyklischer Aminosäuren, wodurch gleichzeitig der Grad einer Verunreinigung durch zelluläre Bestandteile ermittelt werden konnte.

Mit Hilfe des Absorptionswerts kann nun die Konzentration nach dem Lambert-Beerschen-Gesetz ( $E = \epsilon \times c \times d$ ) berechnet werden. Dabei richtet sich der Wert von  $\epsilon$  nach der verwendeten Nukleinsäure.

ss DNS = 33 µg/ml

ds DNS = 50 µg/ml

ss RNS = 40 µg/ml

#### **3.4.5 Bestimmung der DNS-Konzentration durch Gelelektrophorese**

Zur Bestimmung der Konzentration des gereinigten DNS-Fragments wurde ein Aliquot auf ein Gel aufgetragen. Als Bezugspunkt zur Mengenbestimmung wurden 0,5 µg des Molekulargewichtsmarkers 1 kb-Ladder (Gibco) eingesetzt, dessen 1636 bp-Bande 10 % der aufgetragenen Gesamtmenge (=50 ng) entspricht. Die Mengenbestimmung erfolgte durch optischen Vergleich der Helligkeit der Bande mit den Markerbanden.

### 3.4.6 Sequenzanalyse

Zur Sequenzanalyse wurden 10 µg der DNS eingedampft und an die Firma MWG-Biotech (Ebersberg) geschickt. Eine Auswertung der erhaltenen Sequenzdaten erfolgte über die Computer Programme EditSeq bzw. Megalign.

## 3.5 Methoden zur DNS-Klonierung

### 3.5.1 Aufreinigung von PCR-Produkten oder DNS aus Agarosegelen

Die Aufreinigung basiert auf einer reversiblen Bindung der DNS an eine Silikatmatrix in der Gegenwart einer hohen Konzentration von chaotropen Salzen. Darauf folgende Waschschr tte mit dem Hochsalzpuffer entfernen Verunreinigungen wie z.B. Agarose, Proteine oder Salze. Danach kann die DNS mit Niedrigsalzl sungen (TE-Puffer oder H<sub>2</sub>O) wieder von der Silikatmatrix gelöst werden. Es kamen verschiedene Fertigsysteme, die auf diesem Prinzip beruhen, zum Einsatz (Hersteller: Qiagen, Macherey-Nagel und Genomed).

### 3.5.2 Dephosphorylierung von 5'-Enden

Um eine Selbstligation geschnittener Vektor-DNS zu verhindern, wurde diese mit alkalischer Phosphatase behandelt. Hierbei werden die 5'-Phosphatgruppen, welche von Ligasen für ihre Katalyse benötigen werden, entfernt. Da die verwendete alkalische Phosphatase (New England Biolabs, Schwalbach) keinen speziellen Puffer benötigt, konnte die Reaktion in nahezu jedem New England Biolabs-Restriktionsenzym-puffer durchgeführt werden. Hierfür wurde das Enzym (ca. 0,1 U/pmol DNS-Enden) mit der gewünschten DNS gemischt und für 1 Std. bei 37°C inkubiert. Zur Eliminierung des Enzyms und Konzentrierung der DNS wurde der Ansatz über eine Silikatmatrix (Kap. 3.5.1) aufgereinigt.

### 3.5.3 Ligation und Transformation

Durch den Einsatz der DNS-Ligase wird die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den 3'-Hydroxylenden und den 5'-Phosphatenden von DNS-Molekülen katalysiert. Zur Ligation wurden ca. 50 ng Vektor-DNS mit Insert-DNS (im molaren Verhältnis 1:3), 0,5 µl T4-DNS-Ligase (400 U/µl) und 10× Ligasepuffer in einem 10 µl Ansatz für 1 Std. bei RT inkubiert. Für die Transformation wurde der Ligationsansatz mit 100 µl kompetenten *E. coli* Bakterien (Epicurian Coli<sup>®</sup> XL1-Blue MRF') vorsichtig vermischt und für 30 Min. auf Eis inkubiert. Um die Zellen für die DNS durchlässiger

zu machen, erfolgte ein Hitzeschock für 90 s bei 42 °C. Danach wurden die Bakterien mit 500 µl LB-Medium versetzt, bei 37 °C für 1 Std. geschüttelt, 100 µl bzw. 300 µl auf eine LB-Amp-Platte ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C inkubiert. Die aus der Transformation hervorgegangenen Ampicillin-resistenten Klone wurden weiter analysiert.

### **3.5.4 Analytische Plasmid-Präparation**

Diese Methode (modifiziert nach (Birnboim and Doly, 1979)) ermöglicht eine schnelle Überprüfung des in transformierten Bakterien enthaltenen Plasmids. Dazu wurde von jedem zu untersuchenden Klon eine 2 ml LB-Amp-Kultur ü.N. bei 37 °C angezogen. Von dieser Kultur wurde 1 ml kurz abzentrifugiert, das Pellet in 300 µl Resuspensionspuffer aufgenommen, mit 300 µl Lysispuffer vorsichtig vermischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Danach wurden 300 µl einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,5) zugegeben, für weitere 10 Min. auf Eis inkubiert und dann für 15 Min. bei 14000 Upm zentrifugiert.

Der Überstand wurde mit 20 µl Strataclean™ (Stratagene, Heidelberg) versetzt und für 5 Min. bei RT unter häufigerem Vortexen inkubiert. Dieses Reagenz auf Silikatbasis reagiert aufgrund seiner Hydroxylgruppen in ähnlicher Art mit Proteinen wie Phenol, so daß diese schnell und effizient von der zu reinigenden DNS getrennt werden können.

Nach kurzer Zentrifugation wurde die DNS im Überstand in einem neuen Reaktionsgefäß mit dem 0,7-fachen Volumen Isopropanol gefällt, 15 Min. bei 4 °C und 14000 Upm pelletiert, mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 10 µl ddH<sub>2</sub>O aufgenommen. Danach stand sie zur weiteren Analyse mit Restriktionsenzymen zur Verfügung.

### **3.5.5 Plasmid-Maxipräparation**

Diese Methode (modifiziert nach (Birnboim and Doly, 1979)) dient zur Aufreinigung größerer Mengen Plasmid-DNS aus Bakteriensuspension (100 – 500 ml) und wurde mit dem Plasmid Maxi Kit der Fa. Qiagen (Hilden) mit den darin enthaltenen Materialien durchgeführt.

Eine Übernachtskultur (max. 16 Std.) der Bakterien wurde für 15 Min. bei 4 °C und 3900 g zentrifugiert, das Bakterienpellet in 10 ml Resuspensionspuffer

aufgenommen, mit 10 ml Lysispuffer versetzt, durch Inversion gemischt und für 5 Min. bei RT inkubiert. Dies diente zur Zellyse und Freisetzung der Plasmid-DNS. Zum Fällern von chromosomaler DNS, denaturiertem Protein und Zelltrümmern wurden 10 ml einer 3 M Kaliumacetatlösung (pH 5,5) zugegeben, für 20 Min. auf Eis inkubiert und dann für 30 Min. bei 3900 g und 4 °C zentrifugiert.

Der Überstand wurde auf eine Anionenaustauschersäule, die zuvor mit 10 ml Äquilibrationpuffer behandelt worden war, aufgetragen. Die jetzt an das Säulenmaterial gebundene Plasmid-DNS wurde durch zweimaliges Spülen mit je 30 ml Waschpuffer weiter gereinigt und mit 15 ml Elutionspuffer von der Säule gelöst. Zum Entsalzen und Konzentrieren wurde die DNS mit dem 0,7-fachen Volumen (10,5 ml) Isopropanol gefällt, bei 12000 g in einer Kältezentrifuge pelletiert, das Pellet mit 70 % Ethanol gewaschen und die getrocknete DNS in 50–100 µl H<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.5.6 Proteinase K Verdau**

Die Proteinase K verdaut Proteine die bei nachfolgenden Reaktionen stören könnten. Der Verdau wurde mit 200 µg/ml Proteinase K in 1x Proteinase K Puffer für 2 Std. bei 65 °C durchgeführt.

### **3.5.7 Phenol/Chloroform-Extraktion**

Bei der Phenol/Chloroform-Extraktion werden Nukleinsäuren und Proteine in wässriger Lösung voneinander getrennt. Die DNS befindet sich aufgrund ihrer negativen Ladung in der wässrigen Phase, während Lipide und ungeladene Aminosäuren sich in der Phenol Phase befinden. Geladene Aminosäuren bleiben in der Interphase, welche durch das Chloroform verstärkt wird.

Die Proben wurden mit dem gleichen Volumen an Phenol versetzt, ca. 30 Sekunden gevortext, 5 Min. bei RT inkubiert und 30 s bei 14000 Upm (Eppendorf 5417 C) zentrifugiert. Die wässrige Phase wurde abgenommen und in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Dieser Vorgang wurde zweimal mit Phenol und einmal mit Chloroform wiederholt. Die wässrige Phase enthielt nun die von Proteinen befreite DNS.

### **3.5.8 Ethanol-Präzipitation**

Um die DNS zu fällen, wurde die DNS-haltige Lösung mit 1/10 Volumen 3M NH<sub>4</sub>Acetat pH 4,5 und dem 2-fachen Volumen absolutem Ethanol versetzt. Die

Fällung erfolgte für mindestens 2 Std. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Danach wurde die präzipitierte DNS durch eine 45 minütige Zentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 14000 Upm (Eppendorf 5417 C) pelletiert. Das Pellet wurde mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in ddH<sub>2</sub>O aufgenommen.

### **3.6 Methoden zur Identifikation von Protein-DNS Interaktionen**

#### **3.6.1 Herstellung des Kernextraktes aus HepG2 Zellen**

Die Herstellung der Kernextrakte erfolgte nach einem Protokoll aus „Current Protocols in Molecular Biology“ (Ausubel et al., 1998). Zunächst wurden die bis zur Konfluenz gewachsenen HepG2 Zellen von 8 Triplex Zellkulturflaschen (Nunc) wie bereits beschrieben trypsiniert, in PBS aufgenommen und bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  1200 Upm (Jouan-Zentrifuge CR422) pelletiert. Der Überstand wurde vollständig abgesaugt und das Pellet in 15 ml eines hypotonischen Puffers resuspendiert. Bei diesem Schritt werden die verbliebene Salze aus dem PBS entfernt, welche ein späteres effizientes Anschwellen der Zellen, aufgrund des osmotischen Gefälles zwischen Cytoplasma und Puffer, verhindern würden. Die Zellen wurden erneut bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  1200 Upm (Jouan-Zentrifuge CR422) zentrifugiert, der Überstand vollständig abgenommen und das Pellet in 6 ml des hypotonischen Puffers resuspendiert. Es folgte eine 10 minütige Inkubation auf Eis bei der die Zellen bis auf ein doppeltes Volumen anschwellen. Nach Ablauf der Zeit wurden die Zellen durch ein 10 maliges „hoch und runter“ in einem Glas-Douncer homogenisiert. Zur Kontrolle der Lysiseffizienz wurden ca. 200 µl des Homogenats mit Trypan-Blau versetzt, kurz inkubiert, auf einen Objektträger überführt und unter dem Mikroskop ausgewertet. Der passiv in die Zelle diffundierte blaue Farbstoff wird bei intakten Zellen über einen aktiven Transport aus der Zelle hinausgeschleust. Die Zellen bleiben farblos. In den lysierten Zellen hingegen reichert er sich an und es kommt zu einer Blaufärbung der Zellen bzw. der Zellkerne. Die Lysisrate sollte 80-90 % betragen.

Die nun lysierten Zellen mit noch intakten Zellkernen wurden bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  4000 Upm (Jouan-Zentrifuge CR422) 15 min. zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei der nun folgenden Extraktion der Kerne wurde unter ständigem Rühren auf Eis tröpfchenweise ein hypertonischer Puffer hinzugegeben. Die Menge des Puffers sollte ca. die Hälfte des bei der Zentrifugation entstandenen Pellets ausmachen. Anschließend wurde 30 Min., unter konstantem Rühren auf Eis inkubiert. Nach einer abschließenden 30 minütigen Ultrazentrifugation bei  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  und 20000 Upm

(Beckmann Optima™ L-70 K, Rotor SW60Ti,) wurde der Überstand abgenommen (ca. 4 ml) und 2 Std. bei 4 °C mit einer 100 mM KCl-Lösung (Ultrahülsen UH 100/25, Fa. Schleicher & Schuell, Dassel) dialysiert. Der Kernextrakt wurde aliquotiert und bei -70 °C tiefgefroren. Ein Teil wurde zur Proteinbestimmung (Kap. 3.2.2) eingesetzt.

### **3.6.2 *In vitro* SP6/T7 Transkription/Biotin *in vitro* Translation**

Die *in vitro* Transkription bzw. Translation wurden mit einem kommerziell erhältlichen Kit der Firma Boehringer Mannheim nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Hierbei werden zunächst linearisierte DNS-Sequenzen, die stromabwärts vom SP6 oder T7 Promotor kloniert sind, in gecappte mRNS transkribiert. Die so transkribierte mRNS wird mit einem Reticulocyten Lysat und durch die Zugabe von biotin-markierter Lysin-tRNS in biotin-markierte Proteine translatiert. Zur Kontrolle wurden die Proteine in einem 12 %-igen SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 3.7.2) aufgetrennt. Zur Größenbestimmung wurden 7 µl Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham, Braunschweig) eingesetzt. Die aufgetrennten Proteine wurden mittels Western-Blot (Kapitel 3.7.4) auf eine PVDF Transfermembran transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem BrightStar™ BioDetect™ Kit der Firma Ambion (Austin, Texas) (Kapitel 3.3.9). Das transkribierte Protein wurde bei -20 °C gelagert.

### **3.6.3 Gelretardationsanalyse (Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA))**

Der Elektrophoretic Mobility Shift Assay (EMSA) ist eine einfache und schnelle Methode zur Identifikation sequenzspezifischer DNS-bindender Proteine (Ausubel et al., 1998). Die Bindung eines Proteins an ein markiertes DNS-Fragment verzögert dessen Laufeigenschaften während der Elektrophorese auf einem nichtdenaturierenden Polyacrylamidgel (PAGE). Es ergibt sich ein von dem jeweiligen Protein-DNS-Komplex individuell abhängiges verschobenes Bandenmuster (bandshift). Durch die Zugabe proteinspezifischer Antikörper zu der Bindungsreaktion lassen sich einzelne am Protein-DNS-Komplex beteiligte Proteine identifizieren. Ist das Protein nicht an der Komplexbildung beteiligt, so führt die Zugabe des Antikörpers zu keinerlei Effekt. Wird das Protein von dem Antikörper erkannt, so kann es entweder zu einem Block der Reaktion führen oder aber zur

Ausbildung eines Komplexes aus Antikörper-Protein-DNS. Die Folge ist ein weiteres Verschieben der Bande im Gel (supershift).

### 3.6.3.1 Markierung der Oligonukleotide

Die Markierung der Oligonukleotide erfolgte mit Hilfe des „Klenow-Fragments“ einer DNS-Polymerase aus *E.coli*, welche im Gegensatz zum Holoenzym keine 5'-3'- bzw. 3'-5'-Exonukleaseaktivität aufweist. Durch die Zugabe eines radioaktiv markierten Nukleotids ( $^{32}\text{P}$ -dCTP) zu dem Reaktionsansatz werden die überhängenden Enden der Oligonukleotide aufgefüllt und mit  $^{32}\text{P}$  markiert.

Ein typischer Markierungsansatz sah wie folgt aus:

1  $\mu\text{l}$  ds Oligo (5 pmol/ $\mu\text{l}$ )

5  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -dCTP (50  $\mu\text{Ci}$ )

1  $\mu\text{l}$  Klenow-Fragment (5 U/ $\mu\text{l}$ )

2  $\mu\text{l}$  10x Klenow-Puffer

1  $\mu\text{l}$  ATP, 1  $\mu\text{l}$  GTP, 1  $\mu\text{l}$  TTP (10 mM)

ddH<sub>2</sub>O zum auffüllen auf 20  $\mu\text{l}$

Der Ansatz wurde für 30 Min. bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde die Reaktion mit 80  $\mu\text{l}$  Stopplösung gestoppt.

Die freien Nukleotide wurden über eine Gelfiltrationssäule (NAP10™, Sephadex G-25, Pharmacia) abgetrennt und die Einbaurate durch Messung von 1  $\mu\text{l}$  Eluat im Szintillationszähler (Liquid scintillation counter, Wallac) bestimmt.

Die fertig markierten Oligonukleotide wurden bei -20 °C tiefgefroren.

### 3.6.3.2 Bindungsreaktion

Von den markierten Oligonukleotiden (Kapitel 3.6.3.1) wurden jeweils 50.000 CPM für eine Bindungsreaktion eingesetzt.

Ein typischer Reaktionsansatz sah wie folgt aus:

5  $\mu\text{l}$  radioaktiv markiertes Oligonukleotid (50.000 CPM)

30  $\mu\text{g}$  Kernextrakt

1  $\mu\text{l}$  Poly dIdC (2 mg/ml)

mit 1x Bindungspuffer auf 20  $\mu\text{l}$  aufgefüllt

Nach dem Ansetzen der einzelnen Proben wurden diese für 30 Min. bei RT inkubiert.

Bei den Supershift-Assays wurden anschließend 1  $\mu\text{l}$  des jeweiligen Antikörpers



hinzupipettiert. Es folgte eine weitere Inkubation von 30 Min. bei RT. Die Proben wurden anschließend auf ein 4 %-iges Polyacrylamidgel aufgetragen.

### **3.6.3.3 Gelelektrophorese**

Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben auf ein 4 %-iges Polyacrylamidgel (BioRad Kammer, 4 mm Spacer, Glasplatten 20 cm x 15 cm) aufgetragen, welches zuvor 1 Std. bei 100 V vorgelaufen war.

Gelansatz:

3 ml 10x TBE

16 ml Acrylamidlg. (Acrylamid:Bisacrylamid 30:0,8)

101 ml ddH<sub>2</sub>O

1000 µl APS

100 µl TEMED

Als Laufpuffer wurde 0,25x TBE verwendet. Um die Laufgeschwindigkeit verfolgen zu können wurden die freien Spuren mit 20 µl 2x Laemmli-Puffer aufgefüllt. Es folgte eine 1,5-2 stündige Elektrophorese bei 33 mA. Anschließend wurde das Gel getrocknet (Kapitel 3.6.5) und auf eine mit Europium beschichtete Lumineszenzfolie gelegt. Die Auswertung erfolgte an einem Phosphoimager (Bioimager Raytest, Straubenhardt) mit Hilfe des Computerprogramms TINA (Raytest, Straubenhardt). Abschließend wurde über Nacht ein Röntgenfilm aufgelegt und am nächsten Tag in einem automatischen Röntgenfilmentwickler entwickelt (Entwicklermaschine Kodak).

### **3.6.4 Trocknen von Polyacrylamidgelen**

Die Gele wurden im Geltrocknungsrahmen zwischen 2 Cellophan-Folien (Roth, Karlsruhe) getrocknet. Hierzu wurden sie zunächst für 30 Min. in eine Lösung aus 20% Ethanol/10% Glycerin gelegt. Pro Gel wurden 2 Blatt Cellophan kurz in H<sub>2</sub>O eingeweicht und anschließend ein Blatt luftblasenfrei auf den Geltrocknungsrahmen aufgelegt. Das Gel wurde nun in der Mitte platziert und mit 1-2 ml 20% Ethanol/10% Glycerin benäßt. Das zweite Blatt Cellophan wurde ebenfalls blasenfrei aufgelegt. Abschließend wurde der Rahmen mit Klammern befestigt. In horizontaler Lage wurde das Gel für 2-3 Tage bei RT getrocknet.

### 3.6.5 DNase I Footprint Analyse

Diese Methode dient dem Lokalisieren einer proteinspezifischen DNS-Bindungsstelle (Ausubel et al., 1998). Die Grundlage hierfür bildet das gebundene Protein, da es die Phosphordiester-Bindungen der DNS vor einer DNase I katalysierten Hydrolyse schützt.

Der zu untersuchende DNS Abschnitt wird an einem Ende radioaktiv markiert und mit gereinigtem Protein bzw. mit Kernextrakt inkubiert. Nach einem Verdau mit DNase I werden die bei der Hydrolyse entstandenen Fragmente auf einem denaturierenden DNS Sequenzgel aufgetrennt und anschließend autoradiografisch nachgewiesen.

#### 3.6.5.1 Herstellung eines $^{32}\text{P}$ -markierten DNS-Fragments für die DNase I Footprint Analyse

Das die potentielle Bindungsstelle enthaltene DNS-Fragment sollte nur an einem Ende markiert sein. Hierzu wurden zunächst 30  $\mu\text{g}$  Plasmid DNS mit einem Restriktionsenzym etwa 150-600 bp unterhalb der Bindungsstelle geschnitten und das entstandene überhängende Ende mit Mungbean Nuklease (1 U/ $\mu\text{g}$  DNS) für 30 Min. bei RT abgedaut. Durch eine Phenol/Chloroform-Extraktion (Kapitel 3.5.7) mit anschließender Ethanol Präzipitation (Kapitel 3.5.8) wurde die Mungbean Nuklease entfernt. Als nächstes wurde mit einem zweiten Restriktionsenzym ca. 25-100 bp oberhalb der potentiellen Proteinbindungsstelle, welches ein überstehendes 5'-Ende generiert, geschnitten. Das entstandene Fragment wurde wie in Kapitel 3.5.1 beschrieben aufgereinigt und dessen Konzentration über ein 1 %-iges Agarosegel bestimmt (Kapitel 3.4.5).

Das entstandene DNS-Stück wurde anschließend durch das Klenow Enzym mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP markiert. Ein typischer Markierungsansatz sah wie folgt aus:

160 ng DNS

5  $\mu\text{l}$  10x Klenow Puffer

1  $\mu\text{l}$  Klenow Enzym (5 U/ $\mu\text{l}$ )

je 1  $\mu\text{l}$  ATP, GTP, TTP (10mM)

5  $\mu\text{l}$   $^{32}\text{P}$ -dCTP (50  $\mu\text{Ci}$ )

auf 50  $\mu\text{l}$  mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auffüllen

Nach einer Inkubation von 30 Min. bei 37 °C wurde der Ansatz mit  $\text{dH}_2\text{O}$  auf 100  $\mu\text{l}$  aufgefüllt und nach Anleitung des Herstellers über eine Gelfiltrationssäule (G50 Sephadex, Boehringer, Mannheim) aufgereinigt. Die Einbaurate wurde durch die

Messung von 1 µl Eluat im Szintillationszähler (Liquid scintillation counter, Wallac) bestimmt.

Das fertig markierte DNS-Fragment wurde bei –20 °C tiefgefroren.

### 3.6.5.2 Bindungsreaktion und DNase I Verdau

Zur Identifikation der Bindungsstelle wurden die Proben mit und ohne Kernextrakt (Kapitel 3.6.1) angesetzt.

5 ng der markierten DNS

1 µl dIdC

5 µl Kernextrakt (30 µg)

mit 1x Bindungspuffer auf 50 µl aufgefüllt

Die Proben wurden für 10 Min. bei 0 °C und anschließend für 2 Min. bei RT inkubiert. Nach Zugabe der DNase I (0,1 U, 5 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM MgCl<sub>2</sub>) wurde 2 Min. lang verdaut und die Reaktion mit 50 µl Stopplösung (1 % SDS, 20 mM EDTA, 200 mM NaCl, 250 µg tRNS/ml) gestoppt. Die Reaktionsansätze wurden, wie in Kapitel 3.5.4 beschrieben, zum Entfernen der DNase I dreimal mit Strataclean gereinigt und anschließend mit Ethanol gefällt (Kapitel 3.5.8). Die Proben wurden bei –20 °C gelagert und vor dem Beladen des Gels aufgetaut und mit 4 µl Urea Loading Buffer gemischt. Als DNS Marker diente der zuvor mit *HpaII* geschnittene Vektor puc 19 (Fragmente: 501 bp; 489 bp; 404 bp; 331 bp; 242 bp; 190 bp; 147 bp; 111 bp; 110 bp; 67 bp; 34 bp). Die entstandenen Fragmente wurden durch das Klenow Enzym mit <sup>32</sup>P-dCTP markiert und über eine Gelfiltrationssäule (G50 Sephadex, Boehringer, Mannheim) aufgereinigt. Die einzusetzende Menge des Markers wurde über eine Verdünnungsreihe bestimmt.

### 3.6.5.3 Sequenziergelelektrophorese

Um die für das Sequenziergel benötigten Glasplatten von Fett, Staub und Seifenresten zu befreien, die ein gleichmäßiges Gießen des Gels behindern könnten, wurden diese nacheinander mit 20 % SDS, Aceton, destilliertem Wasser und 70 % Ethanol gereinigt. Die größere Platte wurde zweimal mit je der Hälfte der Gelbindelösung, die kleinere einmal mit 5 ml des hydrophoben Repell-Silanes beschichtet, was eine späteres Ablösen der kleineren Platte vom Gel wesentlich erleichterte. Die so vorbereiteten Platten wurden seitlich mit Spacern abgedichtet und mit Klammern befestigt.

Gelansatz für ein 6 %-iges Polyacrylamidgel:

50,4 g Harnstoff

18 ml 40 % Acrylamid/Bisacrylamid

12 ml 10x TBE

auf 120 ml mit dH<sub>2</sub>O auffüllen

600 µl APS (10 % in H<sub>2</sub>O)

60 µl TEMED

Die Lösung wurde gut gemischt und zwischen die horizontal liegenden Glasplatten gegossen. Das Gel war nach ca. 2 Std. polymerisiert und konnte so zur späteren Verwendung bis zu eine Woche bei 4 °C gelagert werden.

Für die Elektrophorese wurde das Acrylamidgel vertikal in die Sequenziergelapparatur (Baseace<sup>TM</sup> vertical Sequencer, Stratagene) eingespannt und die Kammer mit 0,6x TBE-Puffer befüllt. Nach einem Vorlauf von 45 Min. bei 50 °C, während dem die Spannung durch das Spannungsgerät (Feathervolt; Stratagene, Heidelberg) temperaturabhängig gesteuert wurde (nach Erreichen von 50 °C bei ca. 3800 V), wurden die Proben für 2 Min. bei 78 °C denaturiert, in die markierten Slots aufgetragen und das Gel für weitere 1 – 1,5 Std. laufen gelassen.

Nach Ablauf dieser Zeit wurde die kleinere Glasplatte entfernt, das Gel in einem Bad aus 10 % (v/v) Essigsäure und 20 % (v/v) Ethanol in H<sub>2</sub>O für 20 Min. fixiert, 5 Min. mit Wasser gespült und für 30 Min. bei 70 °C getrocknet. Für die autoradiographische Auswertung wurde ein Röntgenfilm (Hyperfilm MP, Amersham, Braunschweig) aufgelegt und für mindestens 12 Stunden bei –70 °C in einer Filmkassette exponiert. Die Entwicklung erfolgte in einem automatischen Röntgenfilmentwickler.

### **3.7 Methoden zur Proteinanalyse**

#### **3.7.1 Isolation DNS bindender Proteine anhand eines Biotin/Streptavidin Affinitätssystems**

Diese Methode beruht auf der irreversiblen Komplexbildung der Proteine Biotin und Streptavidin und dient der Isolation von Proteinen aus einem Gemisch.

Ein mit Biotin markiertes DNS-Fragment, welches eine spezifische DNS-Bindungsstelle des zu untersuchenden Proteins beinhaltet, wird hierbei über Streptavidin an ein zuvor mit Streptavidin gekoppeltes magnetisches Kügelchen (Streptavidin Dynabeads, Dynal) gebunden. Beim Mischen des Komplexes aus DNS

und Magentkügelchen mit einem Kernextrakt kommt es zur Bindung des gesuchten Proteins an die DNS. Mittels eines Magneten kann nun das gebundene Protein über die an die Magnetkügelchen gebundene DNS aus der flüssigen Phase isoliert und durch anschließendes Kochen wieder eluiert werden. Die Proben werden über ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und die einzelnen Proteinbanden mittels Coomassie-bzw. Silbernitrat-Färbung nachgewiesen.

### **3.7.1.1 Affinitäts Isolation**

400 µl der bereits mit Streptavidin gekoppelten Magnetkügelchen ( $6-7 \times 10^8$  beads/ml) (Streptavidin Dynabeads, Dynal) wurden zunächst 2x mit 1 % BSA (Roche, Mannheim) in PBS, 2x mit 1 mol/l NaCl/PBS und als letztes zweimal mit TE-Puffer (10 mM/l TrisCL, 1 mM/l EDTA, pH 8,0) gewaschen. Anschließend erfolgt die Zugabe von 250 pmol der Oligonukleotide, die zuvor in 0,5 ml TE-Puffer aufgenommen wurden. Es wurde für 30 Minuten bei Raumtemperatur und kontinuierlicher Rotation inkubiert. Nach einem einmaligen Waschen mit TE-Puffer zum Entfernen ungebundener Oligonukleotide wurden 4 ml des Kernextrakt aus HepG2 Zellen hinzugefügt und mit 30 ml 5x Bindungspuffer gemischt. Es wurde erneut für 30 Minuten bei RT und kontinuierlicher Rotation inkubiert. Nach Ablauf der Zeit wurden die Proben einmal mit 1x Bindungspuffer gewaschen und danach in 60 µl einfach Laemmli-Puffer aufgenommen und das Protein durch Kochen für 5 Min. bei 100°C eluiert. Die Proben wurden anschließend über ein 10 %-iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kapitel 3.7.2). Zum Bestimmen der Proteingröße wurden 20 µl des Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarkers (Amersham, Braunschweig) mit aufgetragen. Die Elektrophorese wurde mit 100 V für das Sammelgel und 150 V für das Trenngel für mehrere Stunden oder bei 10 mA über Nacht durchgeführt. Anschließend wurde das Gel mit Coomassie (Kapitel 3.7.3) gefärbt, fotografiert und die Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Banden wurden zunächst bei -20 °C tiefgefroren und später für die Peptid Massen Fingerprint Analyse (Kapitel 3.7.6) und die Sequenzanalyse (Kapitel 3.7.9) in das Biochemische Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität gegeben.

### 3.7.2 SDS-Polyacrylamid Gelelektrophorese

Zur Analyse und Größenbestimmung wurden die Proteine auf SDS-Polyacrylamid-Bisacrylamid-Gelen im diskontinuierlichen Puffersystem nach Laemmli aufgetrennt. Durch das SDS wird eine annähernd größenproportionale Ladung an die Proteine gebracht und diese daher nach ihrem Molekulargewicht getrennt. Das SDS führt dazu, daß alle Proteine eine negative Ladung haben und daher zum Pluspol wandern, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit größenabhängig ist.

Es wurden 10 %-ige bzw. 12 %-ige Trenn- und 5 %-ige Sammelgele verwendet. Die Gelelektrophorese wurde mit der BioRad Kammer Protean<sup>TM</sup> (München) durchgeführt. Zum Gießen der Gele wurden die gereinigten fettfreien Glasplatten mit „Spacern“ (Abstandhalter) in eine dazugehörige Gießkammer eingespannt und mit Vaseline abgedichtet.

Die Trenn- und Sammelgele wurden nach folgenden Angaben hergestellt.

	<u>12 % Trenngel</u>	<u>10 % Trenngel</u>	<u>5 % Sammelgel</u>
Acrylamidlösung	60 ml	62,1ml	2,5 ml
Trenngelpuffer 4x	37,5 ml	37,5 ml	
Sammelgelpuffer 4x			3,8 ml
H <sub>2</sub> O	52 ml	50 ml	8,7 ml
APS	720 µl	720 µl	75 µl
TEMED	123 µl	123 µl	15 µl
1 % Bromphenolblau			4 µl

Nach dem Gießen der Trenngele, wurde jedes Gel zum Abschluß vor Luftsauerstoff mit 20 % Methanol überschichtet und nach der Polymerisation, über Nacht bei 4 °C gelagert. Am nächsten Tag wurde das Methanol entfernt, die Sammelgellösung eingefüllt und die Teflon-Gelkämme eingesetzt. Die Gele wurden nach dem Polymerisieren in die Elektrophoresekammer eingespannt und die Kammer mit Laufpuffer gefüllt. Die Proben wurden mit 4x Probenpuffer gemischt, kurz abzentrifugiert und auf das Sammelgel aufgetragen. Zur Molekulargewichtsabschätzung wurde ein vorgefärbter Proteinstandard (Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker, Amersham, Braunschweig) mit aufgetrennt. Die

Elektrophorese wurde mit 100 V für das Sammelgel und 150 V für das Trenngel für mehrere Stunden oder bei 10 mA über Nacht durchgeführt.

### **3.7.3 Coomassie-Färbung von Polyacrylamidgelen**

Durch die Coomassie-Färbung lassen sich Proteine im Gel sichtbar machen. Coomassie Brilliant Blau R-50 ist ein Farbstoff, der unspezifisch an fast alle Proteine bindet. Die Nachweisgrenze für die Färbung liegt im Bereich von 0,1- 0,2 µg Protein pro Bande. Nach der Gelelektrophorese wurden die Gele zunächst für 30- 60 Min. in der Coomassie-Färbelösung geschüttelt. Nach Ablauf der Zeit wurde mit Entfärber bis zur gewünschten Bandenstärke entfärbt. Die Gele wurden anschließend getrocknet oder die Proteinbanden für die Peptid Massenfingerprint Analyse (Kapitel 3.7.7) aus dem Gel ausgeschnitten.

### **3.7.4 Silber-Färbung von Polyacrylamidgelen**

Durch Silber-Färbung können Proteinbanden im Gel sichtbar gemacht werden. Es kommt zur Komplexbildung der Ag<sup>+</sup> Ionen mit den Glu-, Asp- und Cys-Resten von Proteinen. Das Silber wird anschließend mit alkalischem Formaldehyd reduziert und fällt aus. Die dabei auftretenden Proteinbanden erscheinen braun bis schwarz. Mit einer Nachweisgrenze von 1- 10 ng Protein pro Bande weist die Silber-Färbung eine 10- 100 fach höhere Empfindlichkeit gegenüber der Coomassie-Färbung (3.7.3) auf. Nach der Elektrophorese wurden die Gele für mindestens 90 Min. zum Fixieren der Proteine in 50 % Methanol inkubiert. Danach wurden sie 5 Min. mit H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in frisch angesetzter Silbernitratlösung geschüttelt. Nach 10 minütigem Waschen in H<sub>2</sub>O wurden sie in Reducer geschwenkt, bis die gewünschte Bandenstärke erreicht war (max. 20 Min.). Zur Fixierung der Färbung wurden die Gele 2 Min. in Fixierer (aus dem Fotolabor) geschwenkt und anschließend 10 Min. mit H<sub>2</sub>O gespült. Die Gele wurden anschließend getrocknet (Kapitel 3.6.4).

### **3.7.5 Western-Blot**

Im Western-Blot werden die Proteine nach der Elektrophorese mittels Elektroblothing (Blot-Kammer Hoefer Instruments) auf eine PVDF Transfermembran (Millipore) transferiert. Es wurde über Nacht mit Transferpuffer bei 10 mA geblottet.

Der Nachweis der Proteine erfolgte am nächsten Tag mit dem BrightStar™ BioDetect™ Kit der Fa. Ambion (Austin, Texas) (Kapitel 3.3.4.5).

### 3.7.6 MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix assisted laser desorption/ionisation time-of-flight mass spectrometry)

Dieses Verfahren dient der Massenbestimmung von Proteinen/Peptiden und wurde von Michael Karas und Franz Hillenkamp Ende der 80-iger Jahre entwickelt (Hubert, 2000). Die Proteine werden zuerst mit einem 1000 bis 10000 fachen molaren Überschuß eines UV-absorbierenden Moleküls (Matrix) gemischt. Nach Verdunstung des Lösungsmittels kommt es zu einer Kokristallisation von Matrix und Analyt bei der die Probenmoleküle in das Kristallgitter der Matrix eingebaut werden. Die mit den Proteinen beladenen Kristalle werden dann in das Hochvakuum des Massenspektrometers eingebracht und mit einem UV-Laser Puls bestrahlt. Dieser setzt explosionsartig die UV-absorbierenden Moleküle und damit auch die eingebauten Proteinionen frei. Die Proteine gehen in die Gasphase über und es liegt nun ein Gasmisch aus elektrisch geladenen Proteinionen vor. Diese Ionen werden durch ein elektrisches Feld auf einen Schlitz zu beschleunigt und fliegen durch diesen in eine feldfreie Vakuum-Flugröhre, den Flugzeitanalysator oder TOF (time of flight). Alle Ionen fliegen die gleiche Strecke ab, nämlich die Länge des TOF und treffen dann auf einen Detektor. Innerhalb des TOF werden die Ionen nach ihrem Masse/Ladungs-(m/z)-Verhältnis aufgetrennt. Dies gelingt, da Ionen mit unterschiedlichen m/z-Werten - bei gleicher kinetischer Energie - in der Beschleunigungsstrecke der Quelle auf unterschiedliche Geschwindigkeiten gebracht werden. Bei bekannter Beschleunigungsspannung und Flugstrecke der Ionen in der feldfreien Vakuum-Flugröhre lässt sich durch die Messung der Flugzeit das m/z – Verhältnis bestimmen. Die Kalibrierung erfolgt über Referenzsubstanzen mit bekannten Massen.

$$m/z = (2 \times e \times U / L^2) \times t^2$$

m = Masse des Ions

z = Ladungszahl

e = Elementarladung

t = Gesamtflugzeit

L = Länge der feldfreien Vakuum-Flugröhre (TOF)

U = Beschleunigungsspannung



### 3.7.7 Peptid Massenfingerprint Analyse

Zunächst wurden die Proteine über ein SDS-Polyacrylamidgel (Kapitel 3.7.2) aufgetrennt und mit Coomassie (Kapitel 3.7.3) gefärbt. Anschließend wurde die zu untersuchende Proteinbande ausgeschnitten und mit einer Protease *in-situ* (Kapitel 3.7.8) verdaut. Die Massenfingerprints der entstandenen Peptidlösungen wurden durch "matrix assisted laser desorption/ionization time-of-flight" (MALDI-TOF) Massenspektrometrie auf einem Vision 2000 Massenspektrometer (Finnegan MAT, Bremen) aufgenommen. Dazu wurde 0,5 µl der Peptidlösung mit 1 µl Matrixlösung (10 mg/ml 2,5-Dihydroxybenzoesäure (DHB) in 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril) auf dem Probenhalter getrocknet. Die Ionen wurden mit einem pulsierten Stickstofflaser (337 nm) generiert. Die positiven Proteinionen wurden beschleunigt und im Reflektormodus nachgewiesen. Kalibriert wurde mit dem Sequazyme Peptidmassenstandard (Perseptive Biosystems).

Die errechneten Peptidmassen wurden anschließend mit theoretischen, aus Datenbanken (Swiss-PROT, TrEMBL) abgeleiteten Peptidmassen verglichen und einem bekannten Protein zugeordnet. Der *in-situ* Verdau wurde von Herrn P. Dotzauer und die Massenfingerprint Analyse sowie die Peptidsequenzierung von Frau Dr. M. Linder am Biochemischen Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Justus-Liebig-Universität durchgeführt.

### 3.7.8 *In-situ* Verdau

Die aus dem Gel ausgeschnittenen Banden wurden in 100 µl aqua bidest aufgenommen und in den "Nebulizer" des Ultrafree-DA Gefäßes (Millipore, Eschborn) gegeben und durch Zentrifugation zerkleinert. Die Gelstückchen wurden auf der Membran 4x mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5, in aqua bidest. und mit 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5, in 40 % Acetonitril, abwechselnd gewaschen und anschließend mit ca. 30 µl Acetonitril dehydratisiert. Die Gelstückchen wurden mit 50 µl Trypsin seq. Grade (Roche Molecular Biochemicals), 1 µg/µl in 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , pH 8,5, versetzt und unter Argon 16 Std. bei 37 °C inkubiert.

Der Überstand wurde durch die Membran zentrifugiert und die Gelstückchen wurden hintereinander mit 50 µl 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 20 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril, 20 µl 60 % Acetonitril und 20 µl Acetonitril extrahiert. Die vereinten Extrakte wurden im Speed Vac-Konzentrator getrocknet und in 20 µl 0,1 % (v/v) Trifluoressigsäure in 30 % (v/v) Acetonitril aufgenommen.

### 3.7.9 Kapillar-HPLC

Die Peptide wurden durch "reversed-phase" HPLC auf einem Kapillar-HPLC-System "Peptider" (BAI) isoliert und die einzelnen Fraktionen automatisch mit dem "Probot" (BAI) gesammelt.

### 3.7.10 N-terminale Sequenzanalyse: Edman-Abbau

Der Edman-Abbau ist ein zyklischer Prozess, bei dem in jedem Reaktionszyklus von einem Ende der Peptidkette die endständige (N-terminale) Aminosäure abgespalten und identifiziert wird. Die Reaktion besteht aus drei getrennten Schritten. Im ersten Schritt, der Kupplung, wird an die freie N-terminale Aminogruppe der Peptidkette das „Edman-Reagenz“ Phenylisothiocyanat (PITC) gekoppelt. Bei der nun folgenden Spaltung wird das entstandene getrocknete PITC-Peptid mit wasserfreier Säure (z.B. Trifluoressigsäure) behandelt. Dabei wird durch einen nukleophilen Angriff des Schwefels an der Carbonylgruppe der ersten Peptidbindung die erste Aminosäure als heterozyklisches Derivat, einer Anilinothiazolinon (ATZ)-Aminosäure abgespalten. Nach dem Abdampfen eines Großteils der flüchtigen Säure wird die kleine, relativ hydrophobe ATZ-Aminosäure, die sich in ihrem Löslichkeitsverhalten vom hydrophilen Restpeptid unterscheidet, mit einem hydrophoben Lösungsmittel (Chlorbutan oder Essigsäureethylester) extrahiert. Die chemisch instabile Aminosäure wird in einem getrennten Schritt, der Konvertierung, zu einem stabileren Derivat, der Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäure umgesetzt. Hierbei wird die instabile Ringstruktur der ATZ-Aminosäure mit wässriger Säure geöffnet und unter erhöhter Temperatur zur thermodynamisch stabileren PTH – Aminosäure umlagert. Das um eine Aminosäure verkürzte Peptid wird getrocknet und kann weiteren Reaktionszyklen unterworfen werden.

### 3.7.11 Peptidsequenzierung

Ausgewählte Peptidfraktionen wurden durch den Edman-Abbau (Kapitel 3.7.10) auf einem Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) Sequencer, Model 477A, mit on-line Analyse der Phenylthiohydantoin (PTH)-Aminosäurederivate aminoterminal sequenziert.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 HBx wirkt einer p53-vermittelten Repression des HBV-Enhancer I entgegen

Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und der Apoptose. Hierbei bewirkt es sowohl die Transaktivierung als auch die Repression einer Vielzahl von Genen (May and May, 1999).

Eigene Vorversuche hatten gezeigt, daß endogen gebildetes p53 den HBV-Enhancer I reprimiert (Fiedler, 1996). Anschließende Versuche mit der HBx exprimierenden Zelllinie HepG2-CMVX8, bzw. der Kontrollzelllinie HepG2-CMVXM2 ergaben, daß HBx einer Repression des HBV-Enhancers I durch endogen produziertes p53 entgegenwirken kann (Fiedler, 1996).

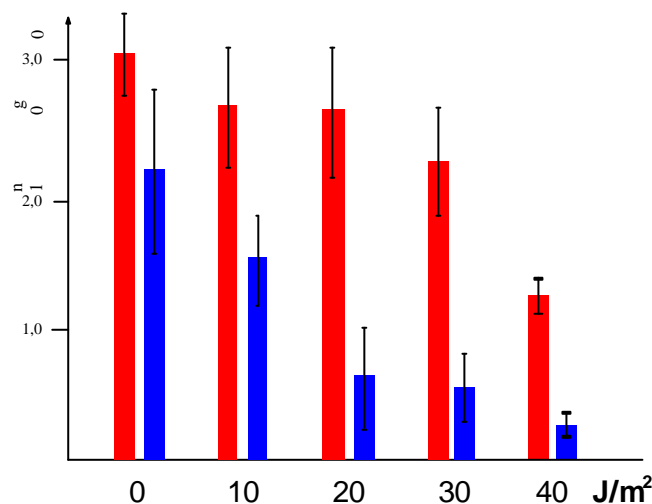
**Tabelle 4.1: Repression des HBV-Enhancers I in AML12-HBx9 bzw. AML12 Zellen durch UV-Licht induziertes p53.** Die HBx exprimierende Zelllinien AML12-HBx9 und die Kontrollzelllinie AML12 wurden mit dem Reportergenkonstrukt für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) pS9 transfiziert und anschließend mit UV-Licht der Stärken 0-, 10-, 20-, 30-, 40- Joule/m<sup>2</sup> bestrahlt. Die Zellyse erfolgte 18 Std. nach Bestrahlung. Die Menge des gebildeten CAT-Proteins wurde in einem CAT-Assay quantifiziert. Aus den errechneten Werten der Dreifachansätze wurde jeweils der Mittelwert bestimmt.

UV-Licht	AML12-HBx9 ng CAT/100 µg Protein	AML12 ng CAT/100 µg Protein
0 Joule/m <sup>2</sup>	3,01 ± 0,31	2,16 ± 0,62
10 Joule/m <sup>2</sup>	2,64 ± 0,44	1,54 ± 0,34
20 Joule/m <sup>2</sup>	2,60 ± 0,49	0,64 ± 0,37
30 Joule/m <sup>2</sup>	2,22 ± 0,40	0,54 ± 0,25
40 Joule/m <sup>2</sup>	1,25 ± 0,13	0,26 ± 0,09

Im Rahmen dieser Arbeit sollten nun die gewonnenen Ergebnisse durch die Verwendung einer anderen stabil HBx exprimierenden Zelllinie bestätigt werden. Hierzu wurden die im Labor von N. Fausto hergestellte murine Zelllinie AML12-HBx9 und als Kontrolle die nicht transfizierte Ausgangszelllinie AML12 gewählt. Die Zellen wurden jeweils im Dreifachansatz mit 0,75 µg des Reportergenkonstruktes pS9, welches die Expression der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) unter Kontrolle des HBV-Enhancers I reguliert, transfiziert. Nach vier Stunden wurden die

transfizierten Zellen mit 0-, 10-, 20-, 30-, 40- Joule/m<sup>2</sup> UV-Licht bestrahlt, um die p53-Expression zu induzieren. Als Positivkontrolle wurde 1 µg des Vektors pcDNA3CAT transfiziert. Die Genexpression der Chloramphenicol-Acetyl-Transferase wird bei diesem Vektor von der CMV major immediate early Enhancer/Promotor-Region reguliert. Als Negativkontrolle dienten unbestrahlte Zellen. Die Zellyse erfolgte 18 Std. nach Bestrahlung.

In den HBx exprimierenden AML12-HBx9 Zellen zeigt sich deutlich, daß HBx einer Repression des HBV-Enhancers I durch p53 entgegenwirken kann (Tab. 4.1 und Abb. 4.1). Selbst bei einer Bestrahlung mit 40 Joule/m<sup>2</sup>, die zu einer maximalen Expression von p53 in den verwendeten Zelllinien führt (Quant, 1998), war die vom HBV-Enhancer I exprimierte Menge an CAT-Protein nur auf 42 % im Vergleich zur Menge an CAT-Protein bei 0 Joule/m<sup>2</sup> reduziert. Im Vergleich zur AML12 Ausgangszelllinie war die CAT-Expression bei 40 Joule/m<sup>2</sup> in den AML12-HBx9 Zellen 5 mal höher.



**Abb. 4.1: Repression des HBV-Enhancers I in AML12-HBx9 bzw. AML12 Zellen durch UV-Licht induziertes p53.** Die Balken geben die Stärke der Expression des HBV-Enhancers I wieder. Die HBx exprimierende Zelllinie AML12-HBx9 (■) und die Kontrollzelllinie AML12 (■) wurden mit dem Reportergenkonstrukt für die Chloramphenicol-Acetyl-Transferase (CAT) pS9 transfiziert und anschließend mit UV-Licht der Stärken 0-, 10-, 20-, 30-, 40- Joule/m<sup>2</sup> bestrahlt. Die Zellyse erfolgte 18 Std. nach Bestrahlung. Die Menge des gebildeten CAT-Proteins wurde in einem CAT-Assay quantifiziert. Aus den errechneten Werten der Dreifachansätze wurde jeweils der Mittelwert bestimmt. (Graphische Darstellung der Daten aus Tabelle 4.1)

#### 4.2 HBx beeinflusst die Menge an gebildeter p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS nach UV-Bestrahlung in AML12 Zellen

Es stellte sich nun die Frage, ob HBx auch noch andere Funktionen von p53 beeinflusst. Dem p53-Protein wird eine große Bedeutung bei der Einleitung der Apoptose zugesprochen (Hall and Lane, 1997). Infolge von DNS-Schädigung (z.B. durch UV-Licht) kommt es zu einer Akkumulation von p53 im Zellkern (Lakin and Jackson, 1999). p53 stimuliert daraufhin die Expression von p21<sup>waf/cip/sdi</sup> und es kommt zu einem Zellzyklusarrest beim Übergang von der G1 in die S Phase. Die Zelle hat nun Zeit zur DNS-Reparatur. Ist die DNS jedoch irreversibel geschädigt, wird die Apoptose eingeleitet (May and May, 1999).

Es konnte gezeigt werden, daß HBx bei einer UV-induzierten Apoptose in HepG2 Zellen pro-apoptotisch, in AML12 Zellen jedoch anti-apoptotisch wirkte (Quant, 1998). Anschließende Versuche mit den gleichen Zelllinien zeigten, daß die Expression von HBx jedoch weder in den HepG2 Zellen noch in den AML12 Zellen einen Einfluß auf die Menge oder Kinetik der p53-Expression nach UV-Bestrahlung hat (Quant, 1998).

Eine weithin akzeptierte Hypothese ist, daß eine starke Expression von p21<sup>waf/cip/sdi</sup> nach Entstehung von DNS-Schäden den Zellen einen Überlebensvorteil vermitteln kann (May and May, 1999). Eine gezielte Deletion des p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Gens führt z.B. dazu, daß die untersuchte Zelllinie nach Induktion von DNS-Schäden nicht mehr einen Zellzyklusarrest, sondern den programmierten Zelltod einleitet (Chen et al., 1996). Es lag nun nahe, den Einfluß von p53 auf die p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Expression in Abhängigkeit von HBx zu untersuchen.

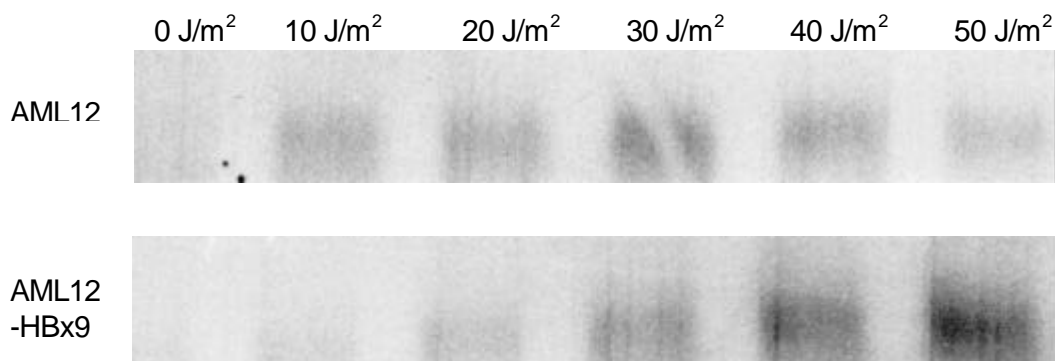
Um einen direkten Einfluß von HBx auf die p53-vermittelte Aktivierung des p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Promotors untersuchen zu können, wurde der Vektor wwpCAT (el Deiry et al., 1995) gewählt und mit verschiedenen Expressionsplasmiden für p53 bzw. HBx in HepG2 Zellen kotransfiziert. In sämtlichen durchgeführten Versuchen konnte jedoch keine Transaktivierung bzw. Repression des p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Promotors erreicht werden, obwohl bereits eine andere Arbeitsgruppe eine Transaktivierung des p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Promotors durch endogen gebildetes p53 beschrieben hatte (el Deiry et al., 1995). Ein Grund dafür könnte sein, daß die Arbeitsgruppe von B. Vogelstein (el Deiry et al., 1995) in ihren Versuchen eine mit einem induzierbaren p53 stabil transfizierte Zelllinie verwendete, während wir transient transfizierten. Bei dem Transfektionsvorgang wird infolge der Zellmanipulation eventuell schon soviel p53

gebildet, daß sich durch anschließend exprimiertes p53 keine Unterschiede in der CAT-Expression des p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Promotors mehr nachweisen lassen.

Parallel durchgeführte Versuche zur Induktion von p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Protein in den HBx transfizierten HepG2 bzw. AML12 Zellen ergaben unterschiedliche Ergebnisse (Quant, 1998). Während sich in den HBx transfizierten HepG2 Zellen weniger p21<sup>waf/cip/sdi</sup> als in der Kontrollzellelinie nachweisen ließ, ergab sich für die AML12 Zellen eine deregulierte p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Expression.

Einem Bericht zufolge kann die Menge an gebildetem p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Protein komplett von der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS Menge abgekoppelt sein (Butz et al., 1998). Aus diesem Grund sollte nun untersucht werden, ob es eventuell HBx vermittelte Unterschiede auf der Ebene der gebildeten p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS in den Zellen gibt.

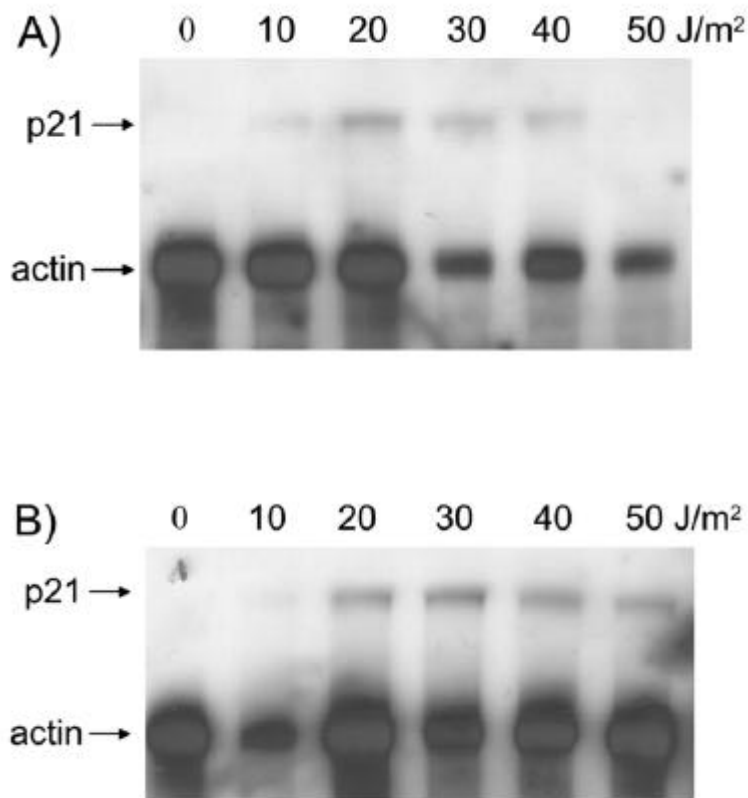
Hierzu wurden von den AML12 Zellen bzw. den AML12-HBx9 Zellen jeweils  $5 \times 10^6$  Zellen auf einer 10 cm Zellkulturschale ausplattiert und am nächsten Tag mit UV-Licht der Stärke 0, 10, 20, 30, 40 und 50 Joule/m<sup>2</sup> bestrahlt. Nach 18 Stunden wurde dann die zelluläre Gesamt-RNS aus den Zellen extrahiert und ihre Konzentration wie in Kapitel 3.4.4 beschrieben bestimmt. Von der RNS wurden jeweils 10 µg pro Ansatz im Northern-Blot (Kapitel 3.3.3) eingesetzt. Zum Nachweis der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS diente ein 480 bp langes p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-DNS-Fragment (Kapitel 3.3.3).



**Abb. 4.2: Nachweis von p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS nach UV-Bestrahlung in den Zelllinien AML12 und der HBx exprimierenden Zelllinie AML12-HBx9 mittels Northern-Blot.** Die Zellen wurden mit UV-Licht der angegebenen Dosen bestrahlt, die RNS nach 18 Stunden aus den Zellen extrahiert und im Northern-Blot eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.2 zu sehen ist, wurde als Folge der UV-Bestrahlung vermehrt p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS in den Zellen gebildet. Während die Menge der gebildeten RNS in den AML12 Kontrollzellen bis zu einem Maximum bei 20 bis 30 Joule/m<sup>2</sup> anstieg und

anschließend die Bandenstärke abnahm, zeigte die HBx exprimierende AML12-HBx9 Zelllinie einen kontinuierlichen Anstieg der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS Menge bis zu der Dosis von 50 Joule/m<sup>2</sup>.



**Abb. 4.3: Nachweis von p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS nach UV-Bestrahlung in HepG2-CMVXM2 (A) und HepG2-CMVX8 (B) Zellen mittels Ribonuklease Protection Assay (RPA).** Die Zellen wurden mit UV-Licht der angegebenen Dosen bestrahlt, die RNS nach 18 Stunden aus den Zellen extrahiert und im RPA eingesetzt.

Diese Versuche sollten nun auch mit den Zelllinien HepG2-CMVXM2 und HepG2-CMVX8 durchgeführt werden. Hierzu wurde jedoch eine noch empfindlichere Methode, nämlich der Ribonuklease Protection Assay (RPA) (Kapitel 3.3.4), gewählt. Die HepG2 Zellen wurden wie oben beschrieben ausplattiert und bestrahlt. Nach Bestimmung der RNS-Konzentration wurden 20 µg wie unter 3.3.4.4 beschrieben im RPA eingesetzt. Als Sonde wurde humane p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS genommen. Als interner Standard wurde humane pTRI-β-Actin-RNS (Fa. Ambion, Austin, Texas) eingesetzt.

Unter Verwendung des SP6–Promotors wurden der  $p21^{\text{waf/cip/sdi}}$ -Vektor sowie die humane pTRI- $\beta$ -Actin Template DNS wie in den Kapiteln 3.3.4.1-5 beschrieben zur Herstellung der nichtradioaktiven biotin-markierten RNS-Sonde verwendet und anschließend im RPA eingesetzt.

Wie in den AML12 Zellen so konnte auch in den HepG2 Zellen eine verstärkte Expression von  $p21^{\text{waf/cip/sdi}}$ -RNS nach UV-Bestrahlung beobachtet werden (Abb. 4.3). Die Menge an gebildeter  $p21^{\text{waf/cip/sdi}}$ -RNS erreichte sowohl in den HBx exprimierenden HepG2-CMVX8 Zellen als auch in der Kontrollzelllinie HepG2-CMVXM2 ein Maximum bei 20 bis 30 Joule/m<sup>2</sup> und nahm bei höheren Dosen deutlich wieder ab.

Vergleicht man abschließend die Ergebnisse in den unterschiedlichen Zellen, so führte die Expression von HBx in den AML12-HBx9 Zellen zu einer veränderten  $p21^{\text{waf/cip/sdi}}$ -RNS Expression nach UV-Bestrahlung, während HBx in den HepG2-CMVX8 Zellen keinen erkennbaren Einfluß auf die Menge an gebildeter  $p21^{\text{waf/cip/sdi}}$ -RNS hatte.

#### **4.3 Einfluß von Transkriptionsfaktoren auf die Transkriptionsregulation von HBV-Enhancer II/Core-Promotor Varianten**

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit war die veränderte Transkriptionregulation durch eine erstmals von (Repp et al., 1992) beschriebene und später von verschiedenen Arbeitsgruppen in vielen HBV-Patientenseren nachgewiesene 8bp-Deletion von Position 1763-1770 (Übersicht in (Günther et al., 1999)). Von der Deletion betroffen sind der HBV-Enhancer II, der Core-Promotor und der carboxyterminale Teil des HBx-Proteins. Im Detail sollte der Einfluß der Deletion auf die Transkription des Enhancer II/Core-Promotors und somit auf die Regulation und Replikation des HBV-Genoms untersucht werden. Versuche mit verschiedenen Reportergenkonstrukten hatten gezeigt, daß die 8bp Variante im Gegensatz zum Wildtyp jeweils um das 2-4 fache aktiver war (Fischer, 2000), obwohl die beschriebene 8bp-Deletion im Bereich des Kernrezeptor responsiblen Elements (nuclear receptor responsible element (NRRE)) liegt (Yu and Mertz, 1997) (siehe Abb. 1.4). Die Bindungsstelle besteht aus zwei Hemipalindromen, die durch eine Base voneinander getrennt sind. Durch die 8bp-Deletion kommt es zum Wegfall des stromabwärts gelegenen Hemipalindroms. In Gelretardationsanalysen (Elektrophoretic mobility shift Assays (EMSA)) mit Kernextrakten aus HepG2 Zellen und Oligonukleotiden, die kurz hinter dem NRRE endeten (siehe Abb. 4.5 D und E),



zeigte sich nur beim Wildtyp eine Verzögerung der Laufeigenschaft des Oligonukleotids durch das Binden eines Proteins, nicht aber bei der Variante mit der 8bp-Deletion (Fischer, 2000). Es stellte sich nun die Frage, wie COUP-TF1 trotz fehlender, für die Bindung notwendiger zweiter Hälfte der Bindungsstelle eine Aktivierung der Reportergenkonstrukte bewirkt, obwohl es doch laut den Ergebnissen aus den EMSAs nicht bindet? Eine mögliche Erklärung dafür wäre, daß COUP-TF1 als Dimer auch dann an die Hemipalindrome binden kann wenn diese durch bis zu 13 bp voneinander getrennt sind (Tsai and Tsai, 1997).

Zunächst wurden EMSAs (siehe Kapitel 3.6.3) mit neuen längeren Oligonukleotiden von Position 1755-1805 durchgeführt. Neben den Oligonukleotiden für den HBV-Wildtyp bzw. die 8bp-deletierte Mutante (siehe Abb. 4.4 A und B) wurde als Vergleich ein Oligonukleotid mit der 8bp-Deletion eingesetzt bei dem die stromabwärts gelegene „TATA“-Box ähnliche Sequenz durch einen Basenaustausch von CA→GC mutiert (Locker and Buzard, 1990) ist (siehe Abb. 4.4 C). Hierdurch kann das „TATA“-Box-Binding-Protein (TBP/TFIID) nicht mehr an die „TATA“-Box binden. Es sollte so ausgeschlossen werden, daß eine Verzögerung der Laufeigenschaft des Oligonukleotids durch eine eventuelle Bindung des im Kernextrakt enthaltenen TBP/TFIID entsteht. Des Weiteren wurde ein Oligonukleotid mit einer Konsensus Sequenz für COUP-TF1 verwendet (siehe Kapitel 2.5). Die Oligonukleotide wurden wie in Kapitel 3.6.3.1 beschrieben mit <sup>32</sup>P-dCTP markiert und im EMSA eingesetzt. Der verwendete Kernextrakt stammte aus HepG2 Zellen.

Wie in Abbildung 4.5 zu sehen ist, zeigte sich bei den Oligonukleotiden von Position 1755-1805 sowohl bei dem Wildtyp als auch bei der 8bp-Deletion, hier jedoch deutlich schwächer, aufgrund der spezifischen Bindung von Proteinen an die DNS eine Verzögerung der Laufeigenschaft der Oligonukleotide. Insgesamt konnten fünf unterschiedlich verzögerte Banden (Bs1-5) beobachtet werden. Die relativ schwache Bs1-Bande wurde nur bei Verwendung der Oligonukleotide mit 8bp-Deletion beobachtet. Demgegenüber traten die starken Banden Bs3 und Bs4 nur bei dem Wildtyp Oligonukleotid auf. Die Bande Bs5 erschien unspezifisch bei allen verwendeten Oligonukleotiden. Die Bande Bs2 war am schwächsten bei dem Oligonukleotid mit der veränderten TBP-Bindungsstelle. Eventuell ist diese Bande auf die Bindung des TBP/TFIID-Komplexes zurückzuführen. Bei dem Oligonukleotid mit der COUP-Konsensus-Sequenz zeigte sich ein deutlich anderes Bandenmuster.

**A) Wildtyp (hbv-1755-1805-bs-sense)**

5'-GATCTT**AGGTTAAAGGTC**TTTGTATTAGGAGGCTGTAGG**CATAAA**TTGGTCTGCGA-3'

„TATA“-Box

**B) 8bp-Deletion (hbv-1755-1805-d8-sense)**

5'-GATCTT**AGGTTAA**TATTAGGAGGCTGTAGG**CATAAA**TTGGTCTGCGA-3'

**GGTCTTTG**  
8bp

**C) 8bp-Deletion (hbv-1755-1805-d8-dTBP-sense) ohne “TATA“-Box, Basenaustausch CA® GC (Locker and Buzard, 1990)**

5'-GATCTT**AGGTTAA**TATTAGGAGGCTGTAGGGC**TAA**TTGGTCTGCGA-3'

**D) wildtyp (hbv-1756-1780-bs-sense) (S.FISCHER)**

5'-**CGGTTAAAGGTC**TTTGTATTAGGAT-3'

**E) 8bp-Deletion (hbv-1756-1780-d8-sense) (S.FISCHER)**

5'-**CGGTTAA**TATTAGGAT-3'

**GGTCTTTG**  
8bp

**F) COUP Konsensus**

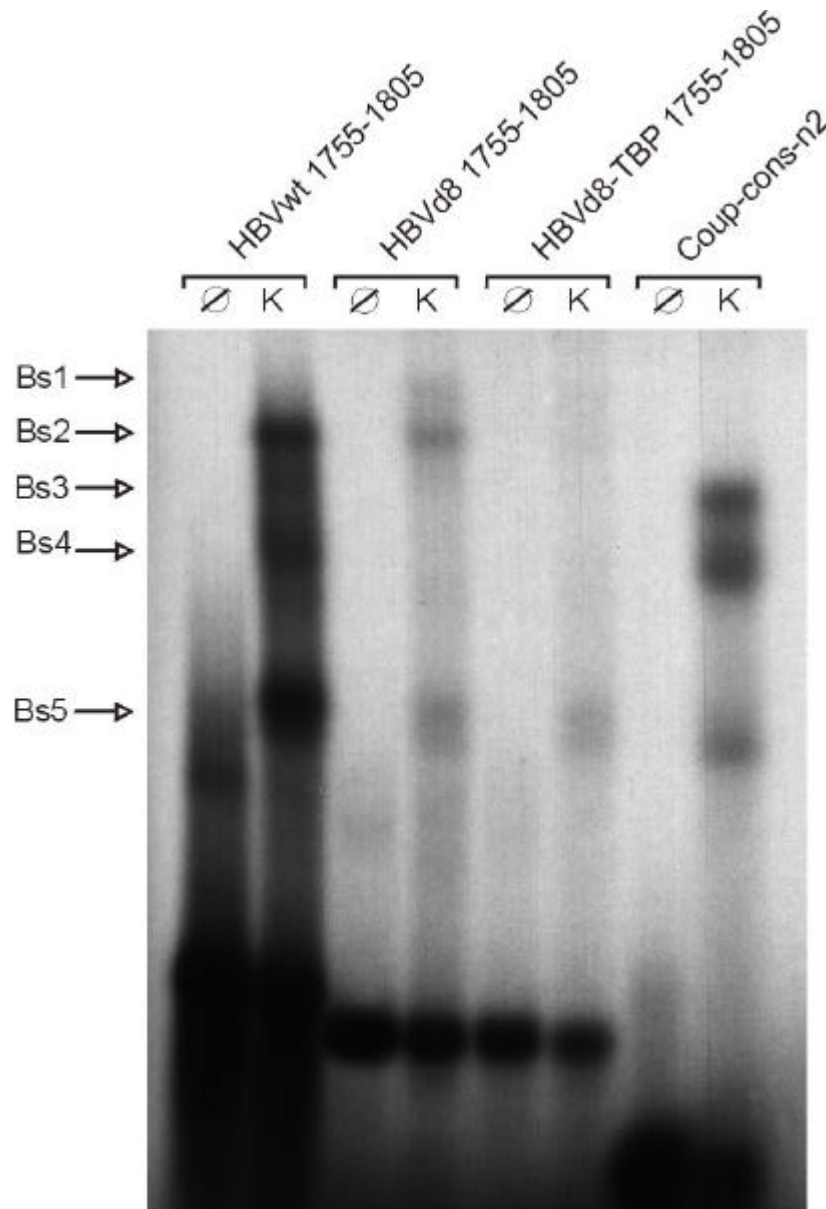
5'-GAT CCT TAG GGG TCA AAG GTC AAA TGG AA-3'

**Abb. 4.4: Sequenz der Oligonukleotide die bei der Gelretardationsanalyse (Electrophoretic mobility shift assay (EMSA)) eingesetzt wurden.** A) HBV-Wildtyp von Position 1755-1805. B) HBV 8bp-Deletion (Repp et al., 1992) von Position 1755-1805. C) HBV 8bp-Deletion (Repp et al., 1992) von Position 1755-1805 mit mutierter „TATA“-Box durch einen Basenaustausch CA→GC (Locker and Buzard, 1990). D) HBV-Wildtyp von Position 1756-1780 (Fischer, 2000). E) HBV 8bp-Deletion (Repp et al., 1992) von Position 1756-1780 (Fischer, 2000). F) COUP Konsensus-Sequenz (Cooney et al., 1992).

Zum Vergleich sollten nun nochmals, die bereits untersuchten kürzeren Oligonukleotide (Fischer, 2000) von Position 1756-1780 für Wildtyp und 8bp Mutante neben den längeren Oligonukleotiden (nt 1755-1805) parallel verglichen werden.

Auch hier konnte durch die Zugabe des Kernextraktes bei den kurzen Oligonukleotiden (nt 1756-1780) (Fischer, 2000) sowohl beim Wildtyp als auch bei der 8bp-deletierten Mutante, aufgrund der spezifischen Bindung von Proteinen an die DNS eine Verzögerung der Laufeigenschaft der Oligonukleotide („Shift“) (Abb. 4.6)

gezeigt werden. Der Shift bei der 8bp-Deletion fiel deutlich schwächer aus. Bei den längeren Oligonukleotiden (nt 1755-1805) zeigte sich auch hier wieder in allen drei Fällen eine identische Verzögerung.



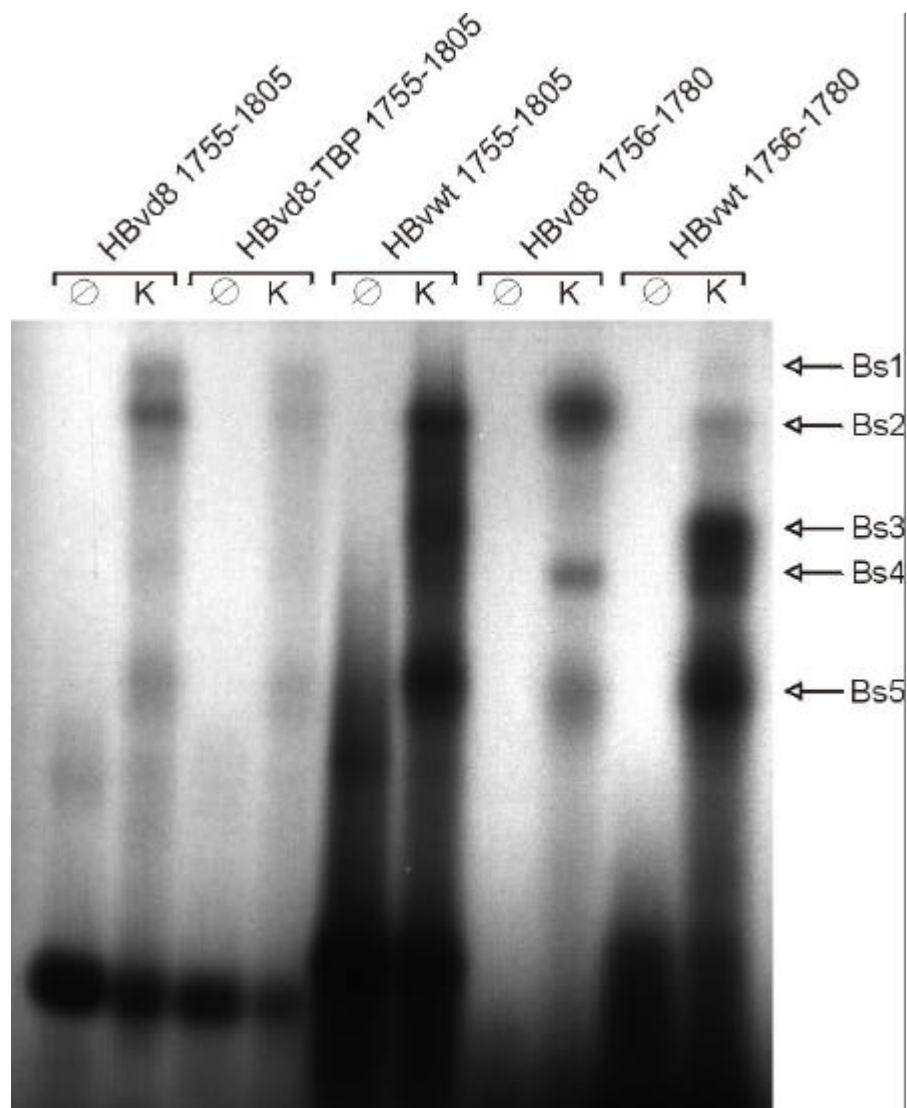
**Abb. 4.5: EMSA der Oligonukleotide (nt 1755-1805) mit und ohne Kernextrakten aus HepG2 Zellen.** Die Oligonukleotide nt 1755-1805 für den Wildtyp, die 8bp-Deletion mit und ohne „TATA“-Box und die COUP-TF1 Konsensus-Sequenz wurden mit  $^{32}$ Pd-CTP radioaktiv markiert und mit/ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen im EMSA eingesetzt. Nach der Auftrennung über ein Polyacrylamid Gel wurde dieses getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert.

Um eine Bindung der Oligonukleotide durch das TBP/TFIID vollkommen ausschließen zu können, sollte nun ein EMSA mit TBP/TFIID-Protein (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg) durchgeführt werden. Durch die Zugabe eines Antikörpers der spezifisch gegen das TBP/TFIID gerichtet ist, sollte ein sogenannter Supershift-Assay (Kapitel 3.6.3 und folgende) durchgeführt werden. Hierzu wurden erneut die bereits verwendeten Oligonukleotide im EMSA eingesetzt. Die Proben wurden mit Kernextrakt bzw. 1  $\mu$ l TBP/TFIID (1 $\mu$ g/ $\mu$ l Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg) angesetzt und nach Ablauf der Inkubationszeit 1 $\mu$ l des Antikörpers TFIID(TBP):sc-273 (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg) hinzupipettiert und erneut inkubiert. Um eine unspezifische Bindung auszuschließen, wurde als Kontrolle der Antikörper Anti-HBs-C 20/02 mit Kernextrakt und TBP/TFIID eingesetzt.

Bei allen gemachten Versuchen konnte keine Bindung durch das aufgereinigte TBP/TFIID erreicht werden (nicht gezeigte Daten). Auch die Zugabe des Antikörpers führte bei keinem der Ansätze zu einer Veränderung der Laufeigenschaft der Oligonukleotide. Ein sogenannter „Supershift“ (Kapitel 3.6.3) mit dem Antikörper konnte weder in den Ansätzen mit dem aufgereinigten Protein (nicht gezeigte Daten) noch in den mit Kernextrakt gezeigt werden. Es zeigte sich weiterhin die bereits beobachtete Verzögerung der Laufeigenschaft durch den Kernextrakt.

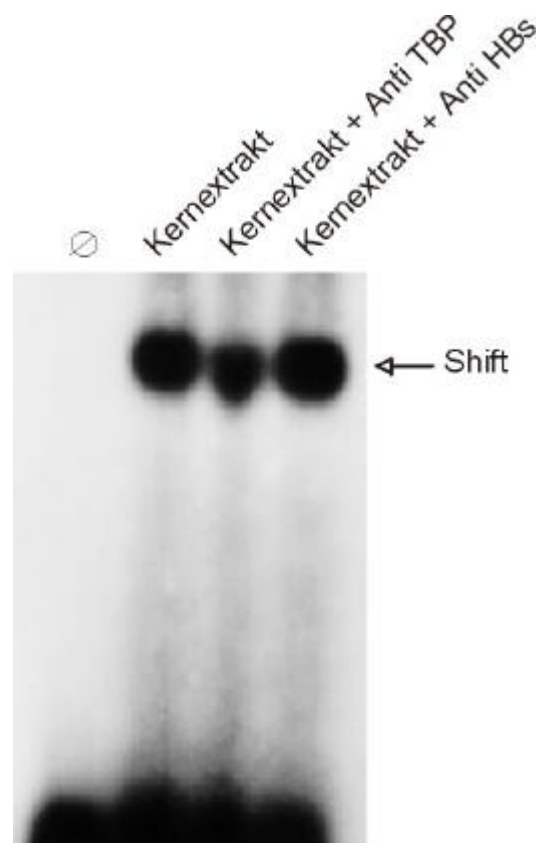
Zur Kontrolle wurde nun als Vergleich versucht mit einem Oligonukleotid welches nur die Konsensus-Sequenz für das TBP/TFIID besitzt (siehe Kapitel 2.5), einen „Supershift“ sowohl mit Kernextrakt als auch mit aufgereinigtem TBP/TFIID-Protein und Antikörper zu erreichen. Auch hier wurde wieder als Vergleich der Antikörper Anti-HBs-C 20/02 mit Kernextrakt eingesetzt.

Auch hier konnte in keinem der durchgeführten Versuche ein Effekt durch eine Bindung des TBP/TFIID an das Oligonukleotid festgestellt werden (nicht gezeigte Daten). Erstaunlicherweise führte eine Zugabe des Antikörpers TFIID(TBP):sc-273 (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg) zu dem Kernextrakt jedoch dazu, daß deutlich weniger Oligonukleotid gebunden wurde und somit ein vermindertes Signal auftrat (Abb. 4.7 Spur 3). Durch eine Bindung des Antikörpers an das Protein ist dieses nicht mehr in der Lage eine Bindung mit der DNS einzugehen. Es steht also weniger Protein für eine Bindung zur Verfügung, was sich in einem verminderten Effekt der Verzögerung zeigt.



**Abb. 4.6: EMSA kurzer (nt 1756-1780) und längerer (nt 1755-1805) Oligonukleotide mit und ohne Kernextrakten aus HepG2 Zellen.** Die Oligonukleotide nt 1755-1805 für den Wildtyp, die 8bp-Deletion mit und ohne „TATA“-Box wurden mit den Oligonukleotiden nt 1756-1780 für Wildtyp und 8bp-Deletion mit  $^{32}\text{Pd}$ -CTP radioaktiv markiert und mit/ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen im EMSA eingesetzt. Nach der Auftrennung über ein Polyacrylamid Gel wurde dieses getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert.

Da in den vorherigen Versuchen weder beim Wildtyp noch bei der 8bp-Deletion mit und ohne „TATA“-Box ein solcher Effekt sichtbar, war konnte eine Bindung durch das TBP/TFIID weitestgehend ausgeschlossen werden.



**Abb. 4.7 Supershift-Assay eines Oligonukleotids mit Konsensus-Sequenz für das „TATA“-box-binding-protein (TBP/TFIID).** Das Oligonukleotid mit der Konsensus-Sequenz für das „TATA“-box-binding-protein (TBP/TFIID) wurde mit  $^{32}$ Pd-CTP radioaktiv markiert und mit Kernextrakt aus HepG2 Zellen, einem Antikörper der TBP/TFIID erkennt ((TFIID(TBP):sc-273 (Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg)) und als Kontrolle dem Antikörper Anti-HBs-C 20/02 im EMSA eingesetzt. Nach der Auftrennung über ein Polyacrylamid Gel wurde dieses getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert.

#### 4.4 Versuche zur Identifikation einer stromabwärts der 8bp-Deletion gelegenen Bindungsstelle für die Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie

COUP-TF1 bindet als Dimer bevorzugt an das durch ein Nukleotid getrennte Palindrom mit der Sequenz GGTC A (Cooney et al., 1992). (Tsai and Tsai, 1997) konnten außerdem zeigen, daß die Basenfolge GG essentiell für eine Bindung durch COUP-TF1 und einige andere Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie ist. Für die Androgen-Reptoren, die Oestrogen-Rezeptoren und die Thyroid-Rezeptoren konnte gezeigt werden, daß ein Basenaustausch von GT nach AA innerhalb der Bindungsstelle dazu führt, daß diese nicht mehr in der Lage sind zu binden (Katalog 2000, Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg). Es sollte nun anhand von EMSAs mit den Oligonukleotiden von Position 1755-1805 untersucht werden, ob stromabwärts des NRREs eventuell noch weitere potentielle Bindungsstellen liegen.

5'-GATCTTAGGTTAAATATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCA-3'

GGTCTTTG

8bp

5'-GATCTTAGGTTAAATTATTAGGAGGCTGTAGGCATAAATTGGTCTGCGCA-3'

↑                      ↑                      ↑                      ↑  
gg1                      gg2                      gg3                      gg4

5'-GATCTTAGAATAAATATTAGGAGGCTGTAGGGGCTTAAATTGGTCTGCGCA-3'

↑  
gg1

5'-GATCTTAGGTTAATATTAGGAGATGTAGGGCTAAATTGGTCTGCGCA-3'

↑  
gg2

5'-GATCTTAGGTTAAATATTAGGAGGCTGTAGACATAAATTGGTCTGCGCA-3'

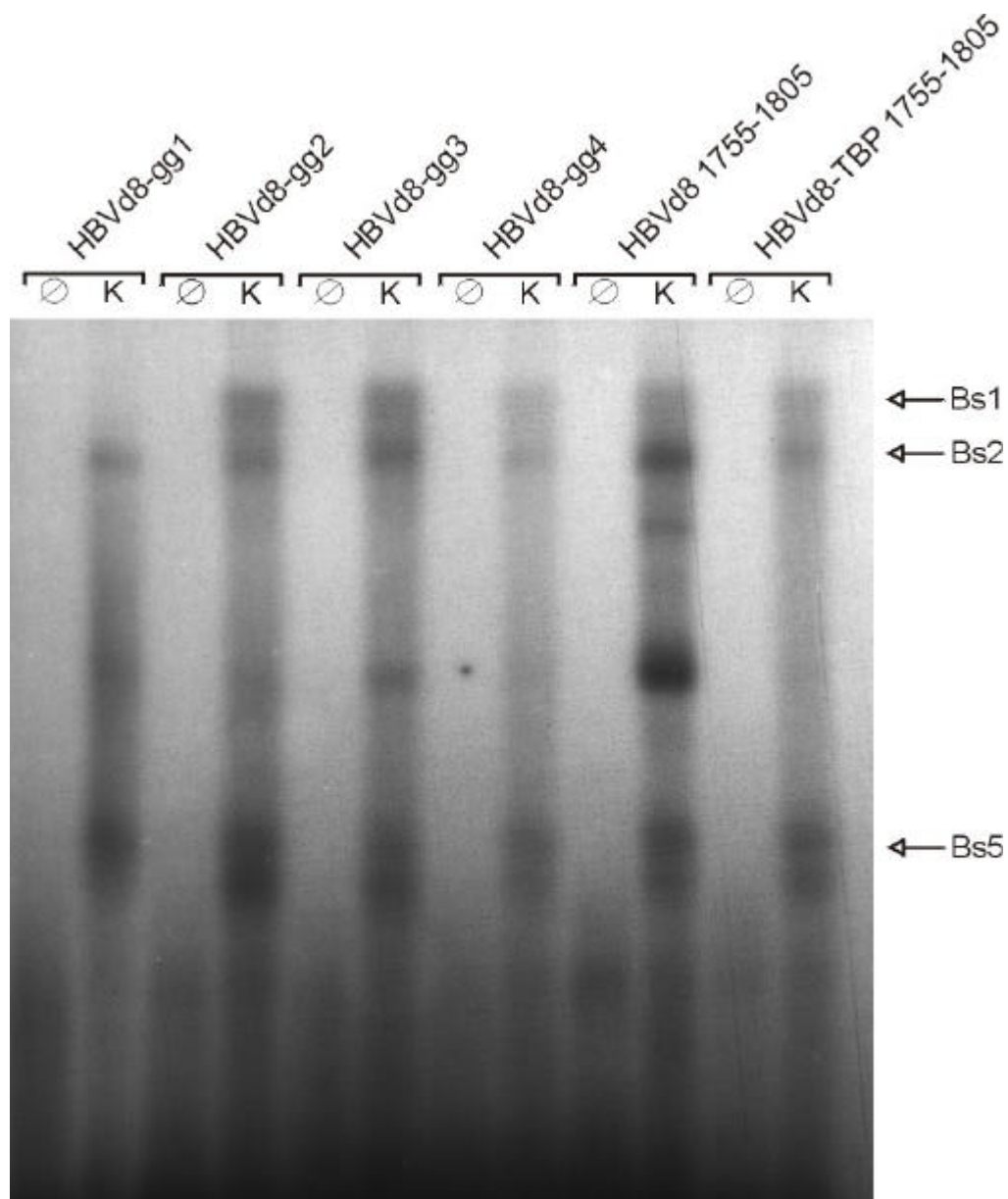
↑  
gg3

5'-GATCTTAGGTTAAATATTAGGAGGCTGTAGGGCTAAATTGAACTGCGCA-3'

↑  
gg4

**Abb. 4.8: Darstellung der potentiellen Bindungsstellen für die Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie.** Dargestellt sind die Oligonukleotide nt 1755-1805 der 8bp-Deletion mit den mutierten potentiellen Bindungsstellen für die Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie. Die Bindungsstellen wurden durch einen Basenaustausch von GN nach AA (Katalog 2000, Santa Cruz Biotechnologies, Heidelberg) modifiziert. Zusätzlich wurde die „TATA“-Box durch einen Basenaustausch von CA nach GC mutiert (Locker and Buzard, 1990). Blau (durch 8bp-Deletion mutierte Bindungsstelle der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie); grün (potentielle Bindungsstellen gg1-gg4); rosa Mutation der potentiellen Bindungsstellen GN→AA; rot („TATA“-Box)

Wie in Abb. 4.8 dargestellt, wurden die möglichen Bindungsstellen mutiert. In allen Oligonukleotiden war neben dem GN Austausch noch die „TATA“-Box mutiert (siehe Abb. 4.4 C). Die einzelnen Oligonukleotide wurden neben den Ursprungs-Oligonukleotiden (nt 1755-1805 mit und ohne „TATA“-Box) für die 8bp-Deletion im EMSA eingesetzt und mit Kernextrakt aus den HepG2 Zellen inkubiert.

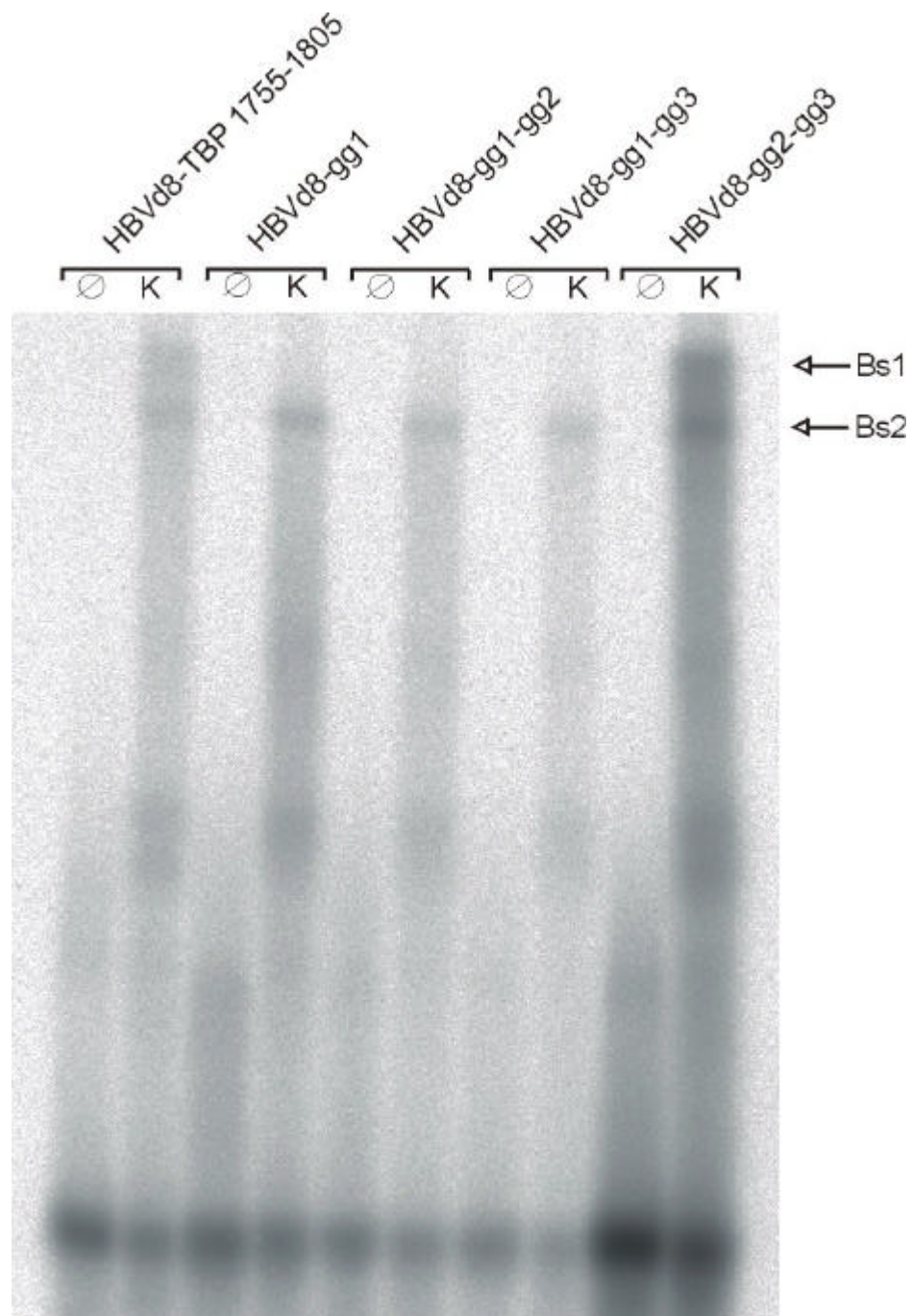


**Abb. 4.9 EMSA der 8bp-Deletion Oligonukleotide nt 1755-1805 mit mutierten potentiellen Bindungsstellen für Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie.** Die Oligonukleotide nt 1755-1805 mit der 8bp-Deletion mit und ohne „TATA“-Box und die 8bp-Deletion mit den mutierten potentiellen Bindungsstellen für die Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie wurden mit  $^{32}$ Pd-CTP radioaktiv markiert und mit/ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen im EMSA eingesetzt. Nach der Auftrennung über ein Polyacrylamid Gel wurde dieses getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert.



Wie in Abb. 4.9 zu sehen ist, konnte bei allen Oligonukleotiden durch die spezifische Bindung von Proteinen an die DNS eine Verzögerung der Laufeigenschaft bei der Zugabe des Kernextraktes beobachtet werden. Bei den Oligonukleotiden mit den Mutationen gg2-4 traten durchgängig die Banden Bs1, Bs2 und Bs5 auf. Nur bei dem Oligonukleotid mit der Mutation an der Stelle gg1 (siehe Abb. 4.8 C) fehlte die Bande Bs1. Demnach scheint hier die Mutation an der Stelle gg1 essentiell für eine Bindung durch ein Protein zu sein. Um zu untersuchen, ob neben gg1 noch eine weitere Bindungsstelle notwendig ist, wurden nun Oligonukleotide verwendet bei denen jeweils 2 potentielle Bindungsstellen gemeinsam mutiert sind.

Bei allen doppelt mutierten Oligonukleotiden konnte aufgrund von spezifischen Bindung durch Transkriptionsfaktoren an die DNS eine Retardation der Oligonukleotide im Gel gezeigt werden (Abb. 4.10). Betrachtet man die Banden Bs1 und Bs2 so zeigte nur das an Position gg2 und gg3 mutierte Oligonukleotid das gleiche Bandenmuster wie das zur Kontrolle verwendete Oligonukleotid mit der 8bp-deletierten Mutante. Bei allen anderen doppelt mutierten Oligonukleotiden die den gg1 Austausch aufwiesen konnte ein Fehlen der Bande Bs1 beobachtet werden. Da letztendlich außer gg1 keine der potentiellen GG-Bindungsstellen essentiell erschien, stellte sich die Frage, an welcher Stelle tatsächlich eine Bindung stattfindet und ob es sich bei dem für die Verzögerung der Laufeigenschaft verantwortlichen Transkriptionsfaktor überhaupt um ein Mitglied der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie handelt.



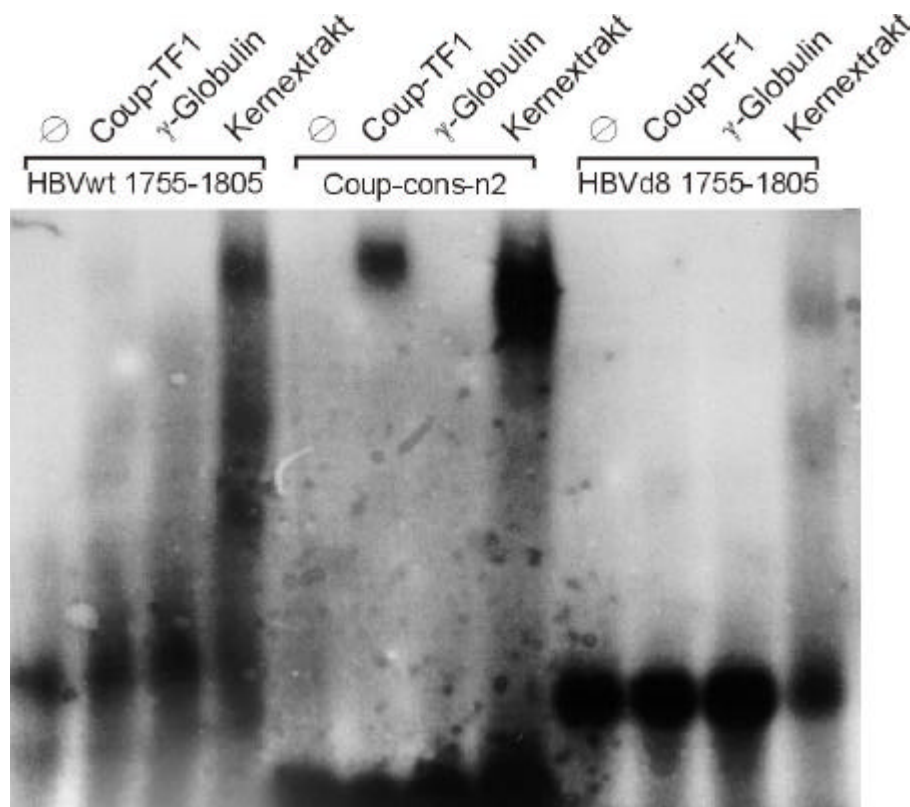
**Abb. 4.10: EMSA der 8bp-Deletion Oligonukleotide nt 1755-1805 mit doppelt mutierten potentiellen Bindungsstellen für die Mitglieder Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie.** Die Oligonukleotide von nt 1755-1805 mit der 8bp-Deletion und den doppelt mutierten potentiellen Bindungsstellen für die Mitglieder Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie wurden mit  $^{32}\text{Pd}$ -CTP radioaktiv markiert und mit/ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen im EMSA eingesetzt. Nach der Auftrennung über ein Polyacrylamid Gel wurde dieses getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert.

#### 4.5 EMSA mit *in vitro* translatiertem COUP-TF1

Es sollte nun untersucht werden, ob COUP-TF1 tatsächlich an die DNS bindet. Hierzu wurde zunächst COUP-TF1 *in vitro* transkribiert und translatiert und anschließend im EMSA eingesetzt.

Die *in vitro* Transkription und Translation wurde wie in Kapitel 3.6.2 beschrieben mit einem kommerziell erhältlichen Kit (Boehringer, Mannheim) nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Hierzu wurde zunächst der Vektor pFLCOUP-TF1 ( Kapitel 2.2) mit dem Restriktionsenzym *DraIII* geschnitten (Kapitel 3.4.1). Das entstandene Fragment mit 2589 bp wurde aufgereinigt und zur Transkription mittels der SP6 Polymerase eingesetzt. Als Positivkontrolle bzw. Negativkontrolle dienten die vom Hersteller mitgelieferte Kontroll-DNS zur SP6 Transkription. Nach Ablauf der Reaktion wurden zur Kontrolle 10 µl des Transkriptionsansatzes in einem 1 % Agarosegel überprüft. Die Translation wurde mit dem „Biotin *in vitro* Translations Kit“ der Firma Boehringer Mannheim nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Anstelle von radioaktiv markierten Aminosäuren wird hier die zuvor transkribierte m-RNS mit Hilfe von Biotin-Lysin-tRNS, bei der das Lysin mit Biotin markiert ist, in nicht radioaktiv markierte Proteine translatiert. Für die Reaktion wurden 10 µl des Transkriptionsansatzes eingesetzt. Als Positivkontrolle diente die vom Hersteller mitgelieferte  $\gamma$ -Globulin-RNS und für die Negativkontrolle wurde H<sub>2</sub>O verwendet. Die Proben wurden mit 12 µl SDS-Ladepuffer versetzt, über ein 12 %-iges SDS-Gel aufgetrennt (Kapitel 3.7.2) und auf eine PVDF Transfermembran transferiert. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit dem BrightStar™ BioDetect™ Kit der Firma Ambion (Austin, Texas) (Kapitel 3.3.4.5).

In den nun folgenden EMSAs wurde neben den Oligonukleotiden für Wildtyp und 8bp-Deletion zum Vergleich ein Oligonukleotid mit einer Konsensus-Sequenz für COUP-TF1 verwendet (siehe Kapitel 2.5). Neben dem Kernextrakt wurde ein Ansatz mit 4 µl des translatierten COUP-TF1 und zur Kontrolle mit 4 µl des translatierten  $\gamma$ -Globulin angesetzt. Als Trägerprotein wurden hierbei 3 µl bovines Serum Albumin verwendet.

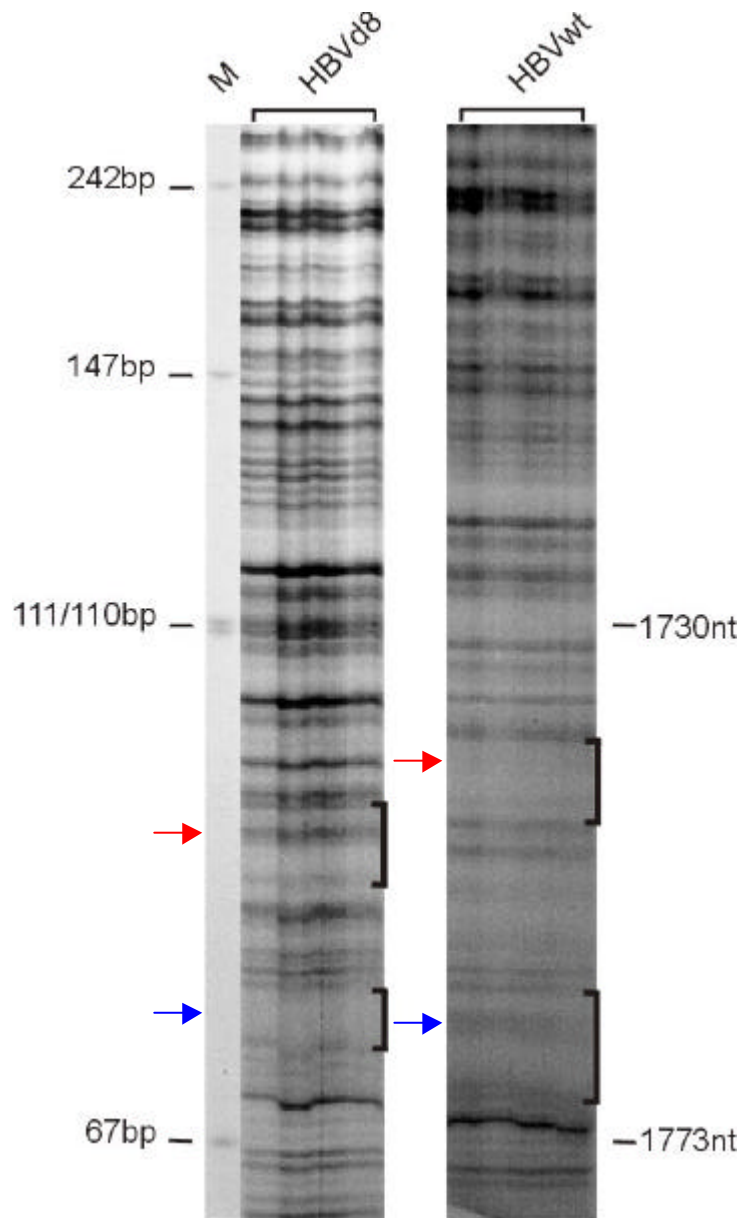


**Abb. 4.11: EMSA mit *in vitro* translatiertem COUP-TF1.** Die Oligonukleotide nt 1755-1805 für den Wildtyp, die 8bp-Deletion und die COUP-TF1 Konsensus-Sequenz wurden mit  $^{32}\text{P}$ -dCTP radioaktiv markiert und mit/ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen im EMSA eingesetzt. Zusätzlich wurde ein Ansatz mit *in vitro* transkribiertem COUP-TF1 und zur Kontrolle einer mit  $\gamma$ -Globuline angesetzt. Nach der Auftrennung über ein Polyacrylamid Gel wurde dieses getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert.

Wie erwartet zeigte sich in den Spuren mit Kernextrakt bei allen drei verwendeten Oligonukleotiden eine Verzögerung der Laufgeschwindigkeit (Abb. 4.11). Die Zugabe von COUP-TF1 führte bei dem Nukleotid mit der Konsensus-Sequenz für die COUP-TF1 Bindungsstelle zu einer deutlichen Bande. Bei der Verwendung des Wildtyp Oligonukleotids ließ sich durch COUP-TF1 wenn überhaupt nur ein sehr schwaches Signal ausmachen, während das HBV-Oligonukleotid mit der 8bp-Deletion überhaupt keinen Shift aufwies.

Diese Ergebnisse zeigen, daß COUP-TF1 als Homodimer, jedoch nur sehr schwach an Wildtyp HBV binden kann. Bei der Durchführung der EMSAs mit Kernextrakt konnte jedoch eine verzögerte Bande, die der mit COUP-TF1 entspricht, nicht beobachtet werden. Demnach werden die mit Kernextrakt beobachteten Banden mit

den Oligonukleotiden für Wildtyp bzw. 8bp-Deletion nicht durch COUP-TF1 Homodimere hervorgerufen.



**Abb. 4.12: DNase I Footprint Analyse.** Die Plasmide pcDNA3-wt-HBx(Koe) (HBVwt) und pcDNA3-8del-HBx(Moe) (HBVd8) wurden mit den Restriktionsenzymen *Hind III* und *XbaI* geschnitten und mit  $^{32}\text{P}$ -CTP radioaktiv markiert. Die erhaltenen DNS-Fragmente wurden mit/ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen in der DNase I Footprint Analyse eingesetzt und über ein Sequenziergel aufgetrennt. Als Marker wurde der *HpaI* geschnittene und radioaktiv markierte Vektor puc 19 verwendet. Anschließend wurde das Gel getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert. Die schwarzen Klammern und die Pfeile gleicher Farbe markieren gleiche Bereiche von wt und 8bp-Deletion bei denen Unterschiede auftreten.

#### 4.6 DNase I Footprint Analysen zur Identifikation einer DNS-Bindungsstelle

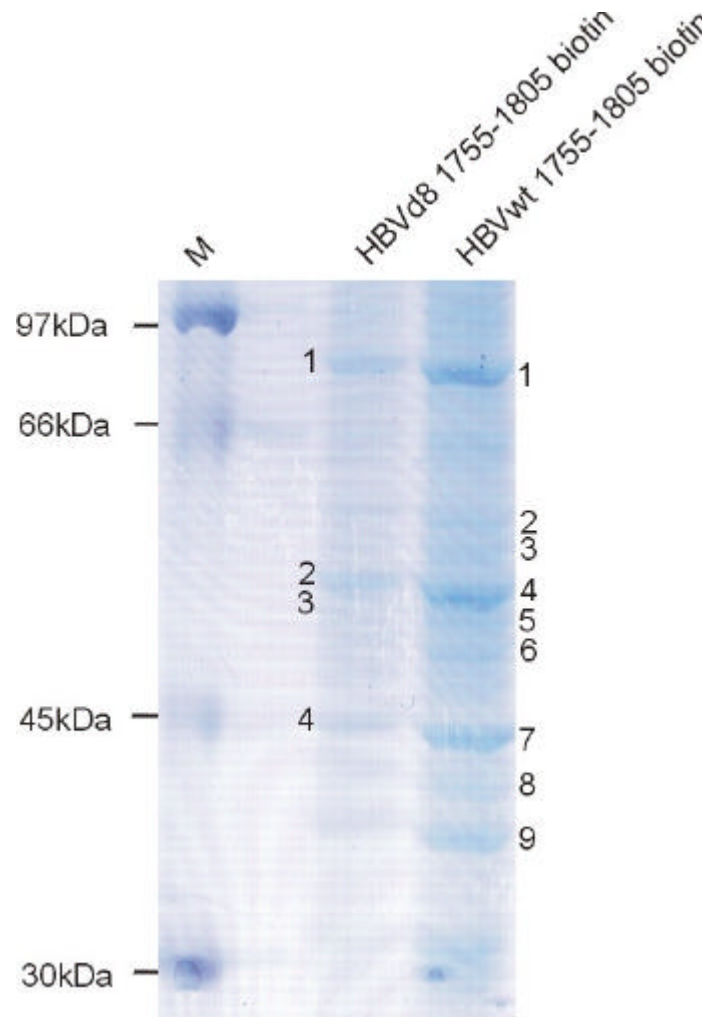
Anhand von DNase I Footprint Analysen (Kapitel 3.6.5) sollte nun untersucht werden, wo im Bereich des NRREs (nuclear receptor response element) eine Bindung durch Kernrezeptoren stattfindet. Hierzu wurde zunächst der zu untersuchende DNS Abschnitt aus den Plasmiden pcDNA3-wt-HBx(Koe) und pcDNA3- $\Delta$ 8del-HBx(Moe) (Kapitel 2.2) mit den Restriktionsenzymen *Hind III* (Schnittstelle an Position 1780) und *XbaI* (Schnittstelle an Position 1841) herausgeschnitten (Kapitel 3.6.5.1). Die isolierten Fragmente wurden anschließend wie in Kapitel 3.6.5.1 beschrieben radioaktiv markiert und nach Bestimmung der Einbaurate in der Fingerprint Analyse eingesetzt. Die Reaktionsansätze wurden jeweils mit und ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen wie in Kapitel 3.6.5.2 beschrieben pipettiert und nach der Inkubation über ein 6 % Polyacrylamid Sequenziergel (Kapitel 3.6.5.3) aufgetrennt. Tatsächlich finden sich im Bereich der 8bp-Deletion sowie stromaufwärts zwei Bereiche, die im Wildtyp- und im Varianten-Enhancer II unterschiedlich geschützt sind (Abb. 4.12).

#### 4.7 Affinitätsisolation von DNS-bindenden Proteinen

Es wurde nun mit Hilfe von biotin-markierten Oligonukleotiden (Wildtyp und 8bp-Deletionsmutante nt 1755-1805) versucht, die daran bindenden Protein zu isolieren und anschließend über eine Peptid Massen Fingerprint Analyse (Kapitel 3.7.7) mittels MALDI-TOF-Massenspektrometrie (Matrix assisted laser desorption ionisation time-of-flight mass spectrometry) (Kapitel 3.7.6) zu analysieren, um gegebenenfalls einen Unterschied der Proteinzusammensetzung festzustellen. Dazu wurden wie in Kapitel 3.7.1 beschrieben zunächst die Oligonukleotide an die mit Streptavidin markierten Magnetkügelchen (Dynabeads M-280) gekoppelt und die Bindungsreaktion durchgeführt. Anschließend wurde einmal mit 1x Bindungspuffer gewaschen und durch ein 5 minütiges Kochen mit Laemmli-Puffer eluiert. Die eluierten Proteine wurden über ein 10 % SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt (Kapitel 3.7.2). Danach wurde das Gel mit Coomassie (Kapitel 3.7.3) blau gefärbt und die in Abb. 4.13 markierten Banden mit einem Skalpell ausgeschnitten. Die Banden wurden dann für die Peptid Massen Fingerprint Analyse (Kapitel 3.7.7) und die Sequenzanalyse (Kapitel 3.7.11) in das hiesige Biochemische Institut des Fachbereichs Humanmedizin gegeben.

Wie in Abbildung 4.13 zu sehen ist, konnte kein Unterschied zwischen Wildtyp und 8bp-Deletion anhand des Bandenmusters der aufgetrennten Proteine festgestellt

werden. An das Oligonukleotid mit 8bp-Deletion banden jedoch deutlich weniger Proteine als an das Wildtyp Oligonukleotid.



**Abb. 4.13: SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung.** Die Proteine wurden anhand von biotin-markierten Oligonukleotiden nt 1755-1805 für den Wildtyp bzw. die 8bp-Deletion und Streptavidin gekoppelter Magnetkugeln aus dem Kernextrakt von HepG2 Zellen isoliert. Nach der Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel wurde dieses mit Coomassie gefärbt. Als Marker wurde der Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham, Braunschweig) eingesetzt.

#### 4.8 Peptid Massenfingerprint Analyse

Die ausgeschnittenen Coomassie Banden wurden zunächst mit Trypsin *in-situ* verdaut (Kapitel 3.7.8) und anschließend wie in Kapitel 3.7.7 beschrieben für die Peptid Massenfingerprint Analyse im MALDI-TOF-Massenspektrometer (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) vorbereitet. Nach dem Messen der

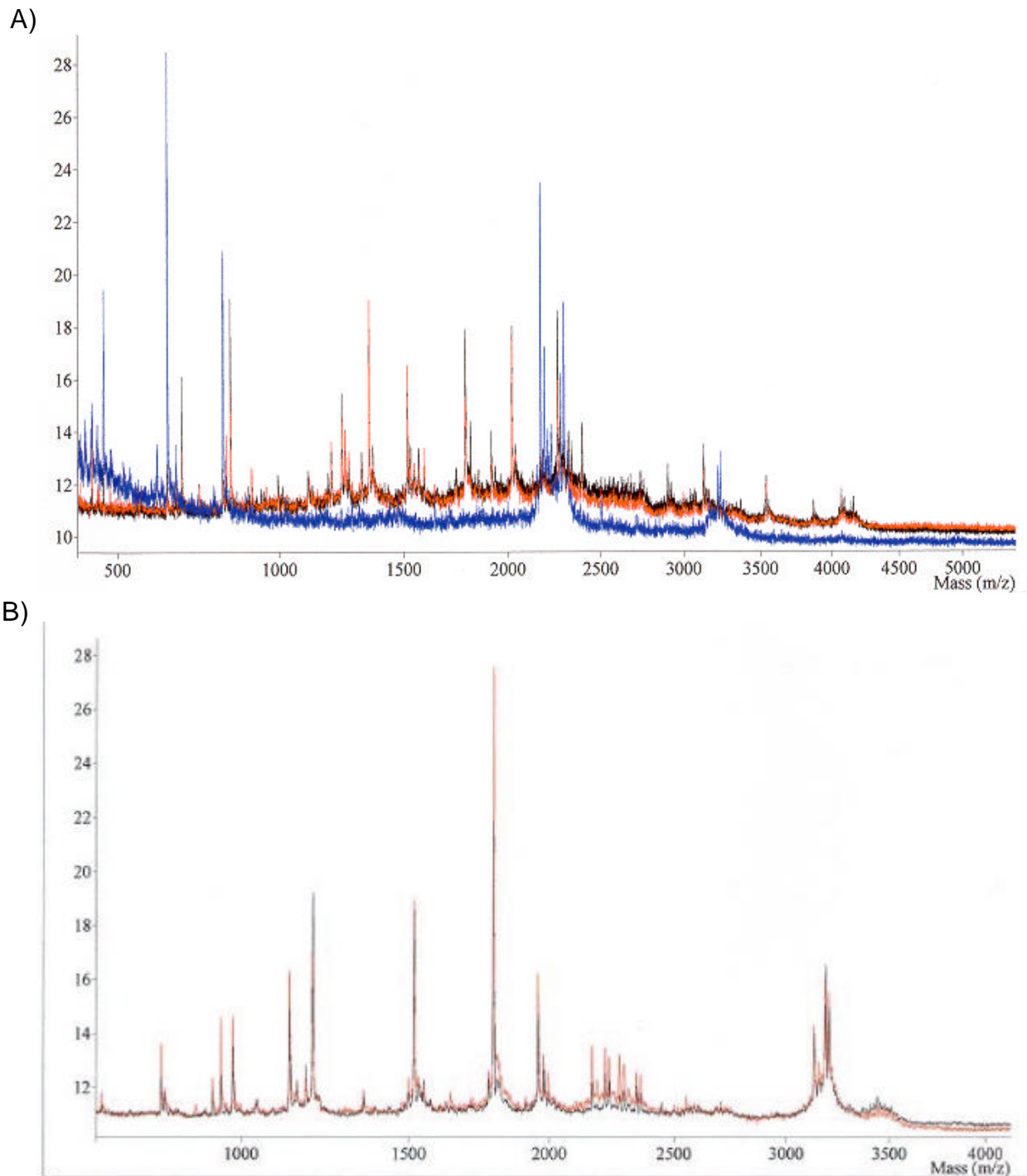
Massenfingerprints mit dem Vision 2000 Massenspektrometer (Finnegan MAT, Bremen) wurden die errechneten Peptidmassen (Tabelle 4.2) der einzelnen Wildtyp- bzw. 8bp-Deletion-Gelbanden miteinander verglichen. Zur Identifizierung wurden die Massen mit theoretischen, aus Datenbanken (z.B. SWISS-PROT, TrEMBL) abgeleiteten Peptidmassen verglichen und wenn möglich einem bekannten Protein zugeordnet. Neben den genannten Datenbanken wurden die Massen auch über die Proteinsuchprogramme der Firmen Proteometrix bzw. MatrixScience analysiert.

Zu den Ergebnissen der Peptid Massenfingerprint Analyse läßt sich zunächst sagen, daß für alle herausgeschnittenen Proteinbanden Peptidmassen bei der MALDI-TOF-MS bestimmt (Tab. 4.2) werden konnten. Beim Vergleich der errechneten Peptidmassen der Proteinbanden 1,4,5,7, (Abb. 4.13) die mit dem Wildtyp Oligonukleotid isoliert wurden, und den Proteinbanden 1,2,3,4 (Abb. 4.13) welche mit dem Oligonukleotid für die 8bp-Deletion isoliert wurden, ergab sich ein identisches Bild. Anhand der Übereinanderlagerungen der erhaltenen Spektrometrien läßt sich erkennen, daß es sich hierbei um die gleichen Proteine handelt (Abb. 4.14 A, B). Die anschließenden Datenbankanalysen der Peptidmassen ergaben jedoch nur im Falle der Banden mit der Nummer 1 ein übereinstimmendes Ergebnis. Hierbei konnte in beiden Fällen das Heat shock Protein 90 kD identifiziert werden. Des Weiteren scheint es sich bei der Proteinbande Nummer 4 aus der Spur der 8bp-Deletion mit großer Wahrscheinlichkeit um das  $\beta$ -Actin zu handeln. Die Datenbankergebnisse für die anderen Proteinbanden ergaben keine signifikanten Ergebnisse. Meist paßten die Massen, der von den Datenbanken vorhergesagten Proteine nicht zu den Massen die anhand des Proteinstandards auf dem Gel geschätzt wurden. Die Tatsache, daß mit den Oligonukleotiden verhältnismäßig viele Proteinen gebunden wurden, führte zu der Annahme, daß in diesem Bereich eine Reihe unspezifischer Faktoren binden. Dafür würde auch das Ergebnis der Datenbankanalyse sprechen, da es sich bei den beiden identifizierten Proteine um eher unspezifisch bindende Proteine handelt.



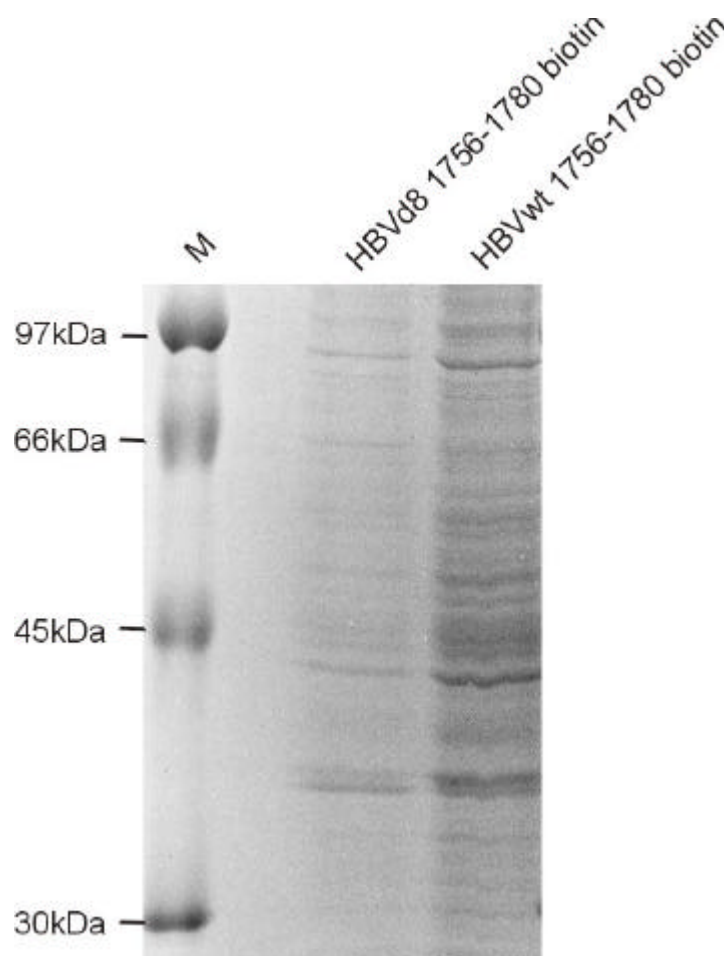
**Tabelle 4.2: Errechnete Peptidmassen der Peptid Massenfingerprint Analyse.** Die Proteinen wurden durch ein Biotin/Streptavidin-Affinitätssystem aus dem Kernextrakt von HepG2 Zellen isoliert und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Nach einer Coomassie Färbung wurden die Proteinbanden ausgeschnitten. Anschließend wurde mit Trypsin *in-situ* verdaut und die entstandenen Peptide zur Massenfingerprint Analyse im MALDI-TOF-Massenspektrometer (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) eingesetzt.

Bande Nr.	Wildtyp Peptidmassen (Da)	Bande Nr.	8bp-Deletion Peptidmassen (Da)
1	829,37; 901,62; 993,65; 1195,33; 1237,21 ; 1250,2; 1318,22; 1349,49; 1514,8; 1528,89; 1565,95; 1784,33; 1810,29; 1912,47; 2016,68; 2257,82; 2393,31; 2898,44; 3123,77; 3535,06; 3865,57; 4064,91	1	829,37; 901,62; 993,65; 1195,33; 1237,21 ; 1250,2; 1318,22; 1349,49; 1514,8; 1528,89; 1565,95; 1784,33; 1810,29; 1912,47; 2016,68; 2257,82; 2393,31; 2898,44; 3123,77; 3535,06; 3865,57; 4064,91
2	840,84; 1158,47; 1206,52; 1256,37; 1784,33; 1862,02; 1877,94; 1933,56; 2089,89; 2237,4; 2467,74; 2553,01; 3020,29; 3156,81		
3	1075,16; 1207,55; 1295,71; 1310,76; 1330,2; 1372,76; 1446,73; 1584,62; 1717,69; 1761,16; 2211,26; 2349,4; 2952,36		
4	906,95; 1026,55; 1104,46; 1245,15; 1315,82; 1342,83; 1406,34; 1703,75; 2009,55; 2417,53; 2501,02; 2518,38; 2534,23; 2679,49; 3555,21	2	906,5; 958,8; 1025,83; 1085,32; 1103,75; 1244,03; 1315,12; 1342,14; 1405,44; 1488,09; 1589,21; 1702,51; 2398,8; 2410,38; 2416; 2516,49; 2532,7
5	906,42; 1039,67; 1103,82 ; 1130,82; 1143,73; 1159,93; 1178,09; 1229,99; 1245,13; 1405; 1569,71; 1621,13; 1780,65; 1960,42; 2088,3; 2800,75; 2831,95; 3104,26; 3118,39; 3552; 4479,9	3	906,11; 1039,46; 1103,63; 1130,51; 1143,42; 1229,52; 1244,53; 1387,03; 1404,83; 1569,55; 1781,37; 1959,69; 2088,01; 2800,26; 3103,24; 3117,92; 4479,43
6	948,51; 1069,56; 1116,28; 1243,37; 1349,88; 1586,23; 1621,09; 1710,58; 1830,84; 2147,42; 2691,5		
7	796,17; 924,61; 946,5; 977,73; 1134,29; 1181,49; 1200,27; 1518,43; 1793,81; 1957,62; 1979,58; 3136,01; 3189,27; 3205,74	4	795,59; 923,78; 945,94; 976,63; 1133,28; 1199,52; 1517,16; 1792,54; 1955,69; 1977,66; 3133,84; 3186,36; 3202,71
8	1094,86; 1344,44; 1678,23; 2057,55; 2109,96; 2125,7; 2180,3		
9	707,05; 796,12; 854,2; 876,28; 993,43; 1131,21; 1149,68; 1158,65; 1307,7,87; 1995,21; 2124,28; 3020,76; 3127,35		



**Abb. 4.14: Massenspektrometrie der Peptid Fingerprint Analyse.** Die Proteine wurden durch ein Biotin/Streptavidin-Affinitätssystem aus dem Kernextrakt von HepG2 Zellen isoliert und über ein SDS-Gel aufgetrennt. Nach einer Coomassie-Färbung wurden die Proteinbanden ausgeschnitten. Anschließend wurde mit Trypsin *in-situ* verdaut und die entstandenen Peptide zur Massenfingerprint Analyse im MALDI-TOF-Massenspektrometer (matrix assisted laser desorption/ionization-time of flight) eingesetzt. A) Massenspektrometrie der Proteinbande 1 für Wildtyp und 8bp-Deletion. B) Massenspektrometrie der Proteinbande 4 für Wildtyp und 8bp-Deletion. Blau: Leerwert, rot: 8bp-Deletion, schwarz: Wildtyp.

In einem weiteren Versuch sollten nun zum Isolieren der Proteine kürzere biotin-markierte Oligonukleotide (nt 1756-1780) eingesetzt werden, um den Bindungsbereich einzugrenzen. Um die unspezifisch DNS-bindenden Proteine wegzufangen, wurde gleichzeitig ein unspezifisches nicht biotin-markiertes Oligonukleotid mit gleicher Basenzusammensetzung aber unterschiedlicher Basenreihenfolge eingesetzt. Der Versuch wurde wie oben beschrieben durchgeführt.



**Abb. 4.15: SDS-Polyacrylamidgel nach Coomassie-Färbung.** Die Proteine wurden anhand von biotin-markierten Oligonukleotiden nt 1756-1780 für den Wildtyp bzw. die 8bp-Deletion und Streptavidin gekoppelter Magnetkügelchen aus dem Kernextrakt von HepG2 Zellen isoliert. Nach der Auftrennung über ein SDS-Polyacrylamidgel wurde dieses mit Coomassie gefärbt. Als Marker wurde der Rainbow-Protein-Molekulargewichtsmarker (Amersham, Braunschweig) eingesetzt.

Wie in Abbildung 4.15 zu sehen ist, konnte auch mit den Oligonukleotiden nt 1756-1780 kein Unterschied zwischen Wildtyp und 8bp-Deletion anhand des

Bandenmusters der aufgetrennten Proteine festgestellt werden. Es zeigte sich jedoch auch hier, daß an das Oligonukleotid mit 8bp-Deletion wieder deutlich weniger Proteine als an das Wildtyp Oligonukleotid banden.

## 5 Diskussion

### 5.1 HBx wirkt einer p53-vermittelten Repression der Transkription entgegen

Störungen bei der Regulation des Zellwachstums und des programmierten Zelltods sind eine Voraussetzung für die Entstehung von Tumoren. Ähnlich wie für die Onkoproteine vieler Tumoviren (Butel, 2000; Lowe and Lin, 2000) konnte auch für das HBx-Protein ein Einfluß auf den programmierten Zelltod beschrieben werden. Während einige Arbeitsgruppen sowohl bei transienten als auch bei stabilen Transfektionsversuchen eine pro-apoptotische Aktivität für das HBx-Protein fanden (Bergametti et al., 1999; Chirillo et al., 1997; Kim et al., 1998; Schuster et al., 2000; Shintani et al., 1999; Su and Schneider, 1997; Terradillos et al., 1998) konnten andere Arbeitsgruppen einen anti-apoptotischen Effekt des HBx beschreiben (Diao et al., 2001; Elmore et al., 1997; Gottlob et al., 1998; Kim et al., 2001; Lee et al., 2000b; Shih et al., 2000; Sohn et al., 2000; Wang et al., 1995). Das Tumorsuppressorprotein p53 spielt eine zentrale Rolle bei der Induktion der Apoptose aufgrund von genotoxischem Stress. Viele Versuche deuten daraufhin, daß HBx in der Lage ist, Funktionen des p53 zu beeinflussen. *In vitro* konnte eine Bindung des HBx an p53 beschrieben werden (Truant et al., 1995; Wang et al., 1994). Des Weiteren scheint HBx einen Effekt auf die intrazelluläre Verteilung von p53 zu haben (Schaefer et al., 1998a; Takada et al., 1997; Ueda et al., 1995). In transienten Transfektionsversuchen zeigte sich, daß p53 eine Repression des HBV-Enhancers I bewirkt (Fiedler, 1996; Ori et al., 1998; Takada et al., 1996). Transiente Transfektionsversuche mit äquimolaren Mengen von Expressionsplasmiden für HBx und p53 zeigten jedoch, daß HBx nicht in der Lage war, einer p53-vermittelten Repression des HBV-Enhancers I entgegen zu wirken (Fiedler, 1996). Dies stimmt mit den Ergebnissen aus der Arbeitsgruppe Koike überein, die zwar von einem antagonistischen Effekt von HBx in transienten Experimenten berichten, diesen aber erst bei einem 100-fachen HBx-Überschuß beobachten konnten (Takada et al., 1996). Sowohl für HBx als auch für p53 lagen bei diesen Experimenten die exprimierten Mengen im unphysiologischen Bereich. Zumindest für HBx ergeben transiente Transfektionen eine HBx-Expression, die weit über derjenigen liegt, welche in chronisch Hepadnavirus-infiziertem Lebergewebe zu finden ist. Nach transienten Transfektionen läßt sich HBx leicht im Western-Blot nachweisen (H. Will sowie C. H. Schröder persönliche Mitteilung). In stabil transfizierten Zelllinien gelingt

der Nachweis per Western-Blot dagegen in der Regel nicht (Doria et al., 1995; Oguey et al., 1996). Nur durch Immunfluoreszenz in stabil transfizierten Zelllinien läßt sich HBx-Protein mit bestimmten Antikörpern gelegentlich nachweisen z.B. (Schaefer et al., 1998a; Schuster et al., 2000). Dies stimmt mit den Ergebnissen aus Biopsiematerial chronisch HBV-infizierter Leber überein. Su et al. gelang zwar ein Nachweis von HBx-Protein in infiziertem Lebergewebe durch Immunfärbung, jedoch nicht durch Western-Blot (Su et al., 1998). Ein Grund für die schlechte Nachweisbarkeit von HBx ist vermutlich die niedrige Expression. In WHV-infiziertem Lebergewebe wurde die Zahl der WHV-Moleküle pro Leberzelle auf 1000-10000 geschätzt (Dandri et al., 1996). Ein weiterer Grund könnte die beobachtete bimodale Halbwertszeit des HBx von 15 Min. und 3 Stunden sein (Schek et al., 1991). Es sollten deshalb in der vorliegenden Arbeit Zellen verwendet werden, deren HBx-Expressionsmuster dem von chronisch HBV-infizierter Leber entspricht. Hierzu wurden die Hepatozytenlinien HepG2-CMVX8, AML12-HBx9 und zum Vergleich die Kontrollzelllinien HepG2-CMVXM2 und AML12 verwendet. Die stabil HBx-transfizierten Zelllinien exprimieren leicht nachweisbare Mengen an HBx-RNS (Fink, 1997; Oguey et al., 1996). Ein Nachweis von HBx-Protein durch Western-Blot gelang nicht (Fink, 1997; Oguey et al., 1996), er war jedoch durch Immunfluoreszenz möglich (Fink, 1997; Oguey et al., 1996). Somit entspricht das Expressionsmuster von HBx in den verwendeten Zelllinien vermutlich annähernd dem in chronisch infiziertem Lebergewebe (Su et al., 1998). Um sicher zu stellen, daß die Zelllinien funktionelles HBx exprimierten, wurden Reportergenkonstrukte mit dem HBV-Enhancer I in die Zelllinien transfiziert (Abb. 4.1). Sowohl in den HBx exprimierenden HepG2 als auch in den AML12-HBx9 Zellen war die Expression des Reportergens stärker als in den mitgeführten Kontrollzelllinien. Somit konnte der Nachweis erbracht werden, daß eine stabile Expression von HBx mit transaktivierenden Eigenschaften verbunden ist. Auch Levrero et al. (1994) konnten *in vivo*, durch die Kreuzung zweier transgener Mausstämme, eine Transaktivierung zweier Reportergene unter der Kontrolle des HIV1-LTR durch HBx zeigen (Balsano et al., 1994). Später gelang auch Kim et. al (1998) ein solcher Nachweis. Eine Besonderheit der von Kim et. al verwendeten Zelllinie ist, daß diese so viel HBx exprimieren, daß HBx-Protein in stabilen Transfektanten im Western-Blot nachweisbar war (Kim et al., 1998).

Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zelllinien wurden genotoxischem Streß durch eine Bestrahlung mit UV-Licht (UV<sub>c</sub>) ausgesetzt. Eine UV-Bestrahlung führt in

den Zellen zu einer starken Akkumulation von p53 (Lakin and Jackson, 1999). Es konnte also davon ausgegangen werden, daß in den Experimenten sowohl für HBx als auch für p53 annähernd physiologische Mengen vorliegen, da die verstärkte p53-Expression durch Induktion mit UV<sub>c</sub> erfolgte. Die Zellen wurden mit einem Reporterkonstrukt transfiziert, das den p53-reprimierbaren HBV-Enhancer I enthielt. Anschließend wurde durch Bestrahlung mit einer steigenden UV-Dosis bis zur fehlenden Nachweisbarkeit des Reporterenzym reprimiert. In den HBx exprimierenden AML12 bzw. HepG2 Zellen war die durch UV-Bestrahlung erzielte Repression - insbesondere bei niedriger Dosis, die nicht zum Tod der bestrahlten Zellen führt - deutlich geringer als in den Kontrollzelllinien (siehe Tab. 4.1 und Abb. 4.1). Auch eine andere Arbeitsgruppen berichtete, daß bei physiologischen p53 Mengen, wie sie nach einer Induktion durch Cisplatin gefunden wird, HBx einer Repression durch p53 entgegen wirkt (Doitsh and Shaul, 1999). Bei diesen Experimenten wurde jedoch ein Expressionsvektor für ein replikationskompetentes HBV-Dimer transient transfiziert und von einer kompletten Aufhebung des reprimierenden Effektes von p53 berichtet. Ein Grund für diesen starken antagonistischen Effekt von HBx könnte die Menge an gebildetem HBx-Protein sein. Bei transienten Transfektionen werden sehr große Mengen an Protein und RNS gebildet während sich in stabil HBx exprimierenden Zellen aufgrund unbekannter Genregulationsmechanismen nur eine sehr schwache HBx-Protein und -RNS Expression nachweisen läßt z.B. (Oguey et al., 1996). Möglich erscheint aber auch, daß andere HBV-Produkte wie z.B. das ebenfalls transaktivierende LHBs einen anti-apoptotischen Effekt zeigen.

Es wurde in dieser Arbeit nicht versucht den Mechanismus des antagonistischen Effektes von HBx auf die Transkriptionsrepression aufzuklären. Eine mögliche Hypothese könnte sein, daß HBx einen stärkeren Transaktivierungseffekt auf Signaltransduktionswege ausübt, die durch den schwächeren Repressor p53 herunterreguliert werden. Zum anderen ist es möglich, daß die p53-vermittelte Transkriptionsrepression auf einer erfolgreichen Konkurrenz um für die Transkription essentieller „Transcription Activation Factors“ (TAF) beruht. Die HBx vermittelte Transaktivierung erfolgt *in vitro* und *in vivo* unabhängig von TAFs, während diejenige des p53 auf TAFs angewiesen ist (Doitsh and Shaul, 1999).

## 5.2 Unterschiedliche Regulation der Expression von p21<sup>waf/cip/sdi</sup> und p53 in stabil HBx exprimierenden AML12 und HepG2 Zellen

Versuche zur Induktion von p53 durch UV<sub>C</sub> in HBx exprimierenden AML12 bzw. HepG2 Zellen, sowie den Kontrollzellen zeigten keinerlei Unterschied hinsichtlich des Einflusses von HBx auf die Menge an exprimiertem p53 (Quant, 1998). HBx verändert also weder die p53-Induktion noch die p53-Stabilität. Infolge von genotoxischem Stress akkumuliert p53 im Zellkern (Lakin and Jackson, 1999). Es wird vermutet, daß hier verschiedene Schritte wie z.B. eine Phosphorylierung, Dephosphorylierung, Acetylierung oder eine post-translationale Modifikation eine Steigerung der Bindungsfähigkeit von p53 an die Promotoren seiner Zielgene bewirken (Lakin and Jackson, 1999). Im Zellkern bindet p53 als Transkriptionsfaktor unter anderem an den Promotor des Cyclin Kinase Inhibitors p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Gens und bewirkt eine Verstärkung der Gentranskription (el Deiry et al., 1993). Es konnte gezeigt werden, daß eine Bestrahlung mit UV<sub>C</sub> zu einer erhöhten p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Expression führt (Lu et al., 1996; Petrocelli et al., 1996; Poon et al., 1996). Sehr hohe UV<sub>C</sub>-Dosen von 40 J/m<sup>2</sup> bzw. 50 J/m<sup>2</sup> führen jedoch zu einer Abnahme der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Expression. Diese Befunde wurden als Ausdruck irreparabler Schädigung der Zelle interpretiert (Lu et al., 1996; Petrocelli et al., 1996; Poon et al., 1996). Versuche, bei denen HepG2 Zellen mit UV-Licht bestrahlt wurden, zeigten eine eher verminderte p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Expression in den stabil HBx exprimierenden Zellen. Gleiche Versuche mit AML12 Zellen ergaben eine deregulierte p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Protein-Expression (Quant, 1998). In anderen, nicht HBV-assoziierten, Systemen konnte gezeigt werden, daß die Menge an gebildetem p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Protein aufgrund von genotoxischem Stress sich deutlich von der Menge an gebildeter p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS unterscheiden kann (Butz et al., 1998).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde untersucht, ob HBx eventuell einen Einfluß auf die p53-vermittelte Transkription von p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS hat. Hierzu wurden die stabil HBx exprimierenden HepG2-CMVX8 Zellen, die AML12-HBx9 Zellen und die jeweiligen Kontrollzellen mit UV-Licht bestrahlt. Die Bestrahlung steigender Dosis führte in den HBx exprimierenden HepG2-CMVX8, den Kontrollzellen HepG2-CMVXM2 und den AML12 Zellen zu einer gesteigerten p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS Expression. Diese erreichte einen Höhepunkt bei 20 bis 30 J/m<sup>2</sup> und fiel bei einer höheren Dosis wieder ab. Im Gegensatz dazu konnte in den HBx exprimierenden AML12-HBx9 Zellen ein kontinuierlicher Anstieg der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS auch bei einer höheren Dosis beobachtet werden. Aus diesen Ergebnissen läßt sich schließen, daß HBx einen



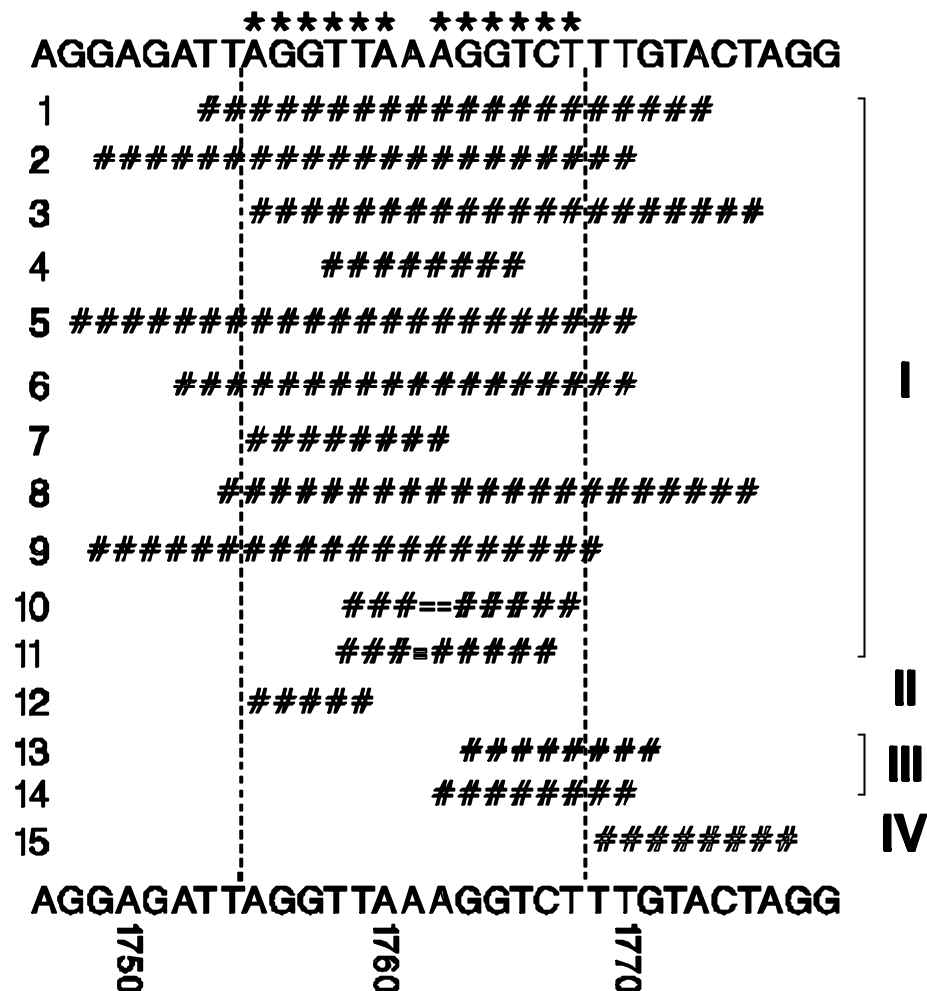
starken Einfluss auf die p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Expression in AML12-HBx9 Zellen hat. Ein Grund dafür könnte sein, daß HBx in den AML12 Zellen den p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Enhancer ohne Mitwirkung von p53 aktiviert (Uchida et al., 1996). Eine andere Möglichkeit wäre, daß HBx die physiologische Aktivierung durch p53 verstärkt. Dafür spräche der Befund von Haviv et al., daß HBx eine p53 vermittelte Transaktivierung massiv verstärken kann (Haviv et al., 1998a). In der Konsequenz läge bei gleichem Stimulus in Gegenwart von HBx mehr p21<sup>waf/cip/sdi</sup> vor. Diese verstärkte Expression von p21<sup>waf/cip/sdi</sup> erinnert an Ergebnisse zum humanen T-Zell-Leukämie Virus 1 (HTLV-1), welches zu einer Transformation von T-Zellen führt (Akagi et al., 1996; Cereseto et al., 1996). Das transformierende Tax-Protein (Mesnard and Devaux, 1999) dieses Virus weist funktionell viele Gemeinsamkeiten mit HBx auf (Faktor and Shaul, 1990). Auch das E7-Onkoprotein des humanen Papillomvirus 16 führt zu verstärkter p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Expression (Morozov et al., 1997; Ruesch and Laimins, 1997), ist aber wie HBx (Benn and Schneider, 1995; Koike et al., 1994) außerdem in der Lage, einen Zellzyklus-Arrest in der G1/S-Phase zu überwinden und die betroffenen Zelle zur Proliferation zu treiben. Die erhöhte p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS-Expression in AML12-HBx9 Zellen könnte dazu führen, daß in für das Überleben der Zellen kritischen Phasen mehr p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Protein zur Verfügung steht. Eine erhöhte p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Protein-Expression wurde als Überlebensvorteil grenzwertig letaler pro-apoptotischer Stimuli angesehen (Chen et al., 1996; May and May, 1999). Somit erscheint es möglich, daß die AML12-HBx9 Zellen durch die im Vergleich zu den Kontrollzellen und zu den HepG2 Zellen verstärkte p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS-Expression nach Apoptoseinduktion durch UV-Bestrahlung partiell vor Apoptose geschützt sind. Tatsächlich wirkte eine HBx-Expression in AML12 Zellen anti-apoptotisch (Fiedler et al., in Vorbereitung; Quant, 1998). Wie es zu der Entkopplung der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Proteinmenge von der RNS-Expression kommt, ist unklar. So könnte in den HBx exprimierenden Zellen, z.B. der RNS-Export gestört sein, die p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Proteinsynthese gehemmt oder auch die Stabilität des p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-Proteins verringert sein.

### **5.3 Einfluß von Transkriptionsfaktoren auf die Transkriptionsregulation einer HBV-Enhancer II/Core-Promotor Variante**

Innerhalb des HBV-Enhancer II/Core-Promotors konnten eine Vielzahl von Mutationen identifiziert werden (Übersicht in (Günther et al., 1999)). Viele der beschriebenen Varianten kennzeichnet eine A→T bzw. G→A Punktmutation an den Positionen 1762 bzw. 1764, die häufig auch als Doppelmutation gleichzeitig auftritt

(Günther et al., 1996b). Daneben konnten eine Reihe von Varianten beschrieben werden, die eine Deletion bzw. Insertion innerhalb des HBV-Enhancer II/Core-Promotors aufweisen (Günther et al., 1999). Viele dieser Varianten machen einen Großteil der Viruspopulation in Patientenseren aus (Schläger et al., 2000) und könnten die Ursache für einen ungünstigen Verlauf einer Hepatitis B Virus Infektion sein (Preikschat et al., 1999). Im Bereich des HBV-Enhancer II/Core-Promotors konnten eine Reihe von Bindungsstellen sowohl für ubiquitär exprimierte als auch für leberspezifische Transkriptionsfaktoren (Übersicht siehe Abb. 1.4) identifiziert werden. Hierzu gehören z.B. Sp1 (SV40 promoter protein 1), HNF-3 (hepatocyte nuclear factor) (Johnson et al., 1995; Li et al., 1995), FTF (fetoprotein transcription factor) (Gilbert et al., 2000; Ishida et al., 2000) und das TATA-box-binding Protein (TBP) (Chen et al., 1995). Auch für viele Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie (Raney et al., 1997; Yu and Mertz, 1997) wie z.B. HNF-4 (hepatocyte nuclear factor), RXR (retinoid X receptor), PPAR (peroxisome proliferator-activated receptor) und COUP-TF1, COUP-TF2 (chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor) (Wang et al., 1989; Yu and Mertz, 1997) konnten Bindungen innerhalb dieses Bereiches nachgewiesen werden. Vor allem die Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie scheinen essentiell für die Synthese der prägenomischen RNS bzw. die HBV-Replikation zu sein (Tang and McLachlan, 2001). Interessanterweise liegen viele der in Varianten beschriebenen Deletionen des Enhancer II/Core-Promotors in der Nähe des NRREs (nuclear receptor response element) (Yu and Mertz, 1996; Yu and Mertz, 1997; Yu and Mertz, 2001). Das NRRE besteht aus zwei Hemipalindromen, die durch eine Base voneinander getrennt sind (Tsai and Tsai, 1997). Allgemein lassen sich die Deletionen innerhalb dieses Bereiches in vier Gruppen einteilen (Abb. 5.1): Gruppe 1 führt zu einer vollständigen Zerstörung der Bindungsstelle, Gruppe 2 bewirkt eine Deletion der 5'-Hälfte der Bindungsstelle für die Kernrezeptorfamilie, Gruppe 3 zerstört die stromabwärts gelegene Hälfte und Gruppe 4 liegt außerhalb der Bindungsstelle.

Durch gezielte Punktmutationen konnte gezeigt werden, daß Veränderungen dieser Bindungsstellen die Regulation des HBV-Enhancer II/Core-Promotors beeinflussen (Yu and Mertz, 1996). Durch Mutationen im Bereich des NRREs (nuclear receptor response element) gelang erstmals eine Trennung der Regulation von präC- und prägenomischer RNS (Yu and Mertz, 1996).



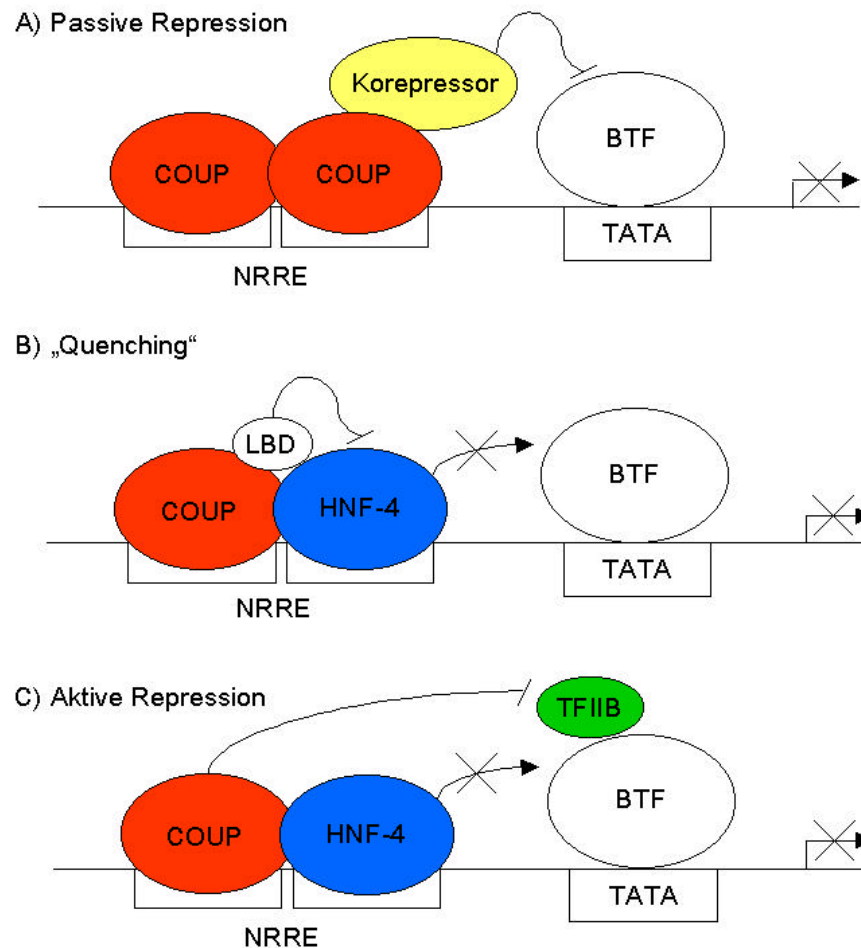
**Abb. 5.1: Deletionen im Bereich des HBV-Enhancer II/Core-Promotors von Patienten (Nr. 1-15) mit chronischer Hepatitis B.** Dargestellt ist das NRRE (nuclear receptor response element). Die Deletion Nr. 13 entspricht der in der vorliegenden Arbeit untersuchten 8bp-Deletion. Modifiziert nach (Kidd-Ljunggren et al., 1997).

Auch die in dieser Arbeit behandelte 8bp-Deletion von Position 1763-1770 (Repp et al., 1992) (Abb. 5.2: Nr. 13) liegt im Bereich der Bindungsstelle für die Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie wie z.B. HNF-4 und COUP-TF1 (Yu and Mertz, 1997). Aufgrund der fehlenden 8 Basenpaare kommt es zum Wegfall des stromabwärts gelegenen Hemipalindroms. Die Deletion wurde erstmals in Gießen bei Kindern entdeckt, die sich gegenseitig unter einer zytostatischen Chemotherapie mit HBV infizierten (Repp et al., 1992; Schläger et al., 2000). Später wurde sie gehäuft bei Patienten unter Immunsuppression nach einer Nierentransplantation (Günther et al., 1996b) beobachtet. Genau wie für die anfangs beschriebenen Doppelmutationen

der Nukleotide 1762/1764 konnte auch für die 8bp-Deletion eine erhöhte Replikation und eine Abnahme des Verhältnisses von HBe/HBcAg beschrieben werden (Günther et al., 1996b). Des Weiteren zeigte sich *in vitro* eine erhöhte Sekretion von Viruspartikeln in das Medium (Günther et al., 1996b). Reporterergenassays mit Konstrukten für den Wildtyp bzw. die 8bp-Deletion ergaben eine 2-4 fach höhere Aktivität des HBV-Enhancer II/Core-Promotors bei der 8bp-Deletion gegenüber dem Wildtyp (Fischer, 2000; Schmidt, 1999). Zunächst wurden Electrophoretic mobility shift Assays (EMSA) mit Oligonukleotiden (nt 1755-1805) für den Wildtyp bzw. die 8bp-Deletion mit Kernextrakt aus HepG2 Zellen durchgeführt. Sowohl bei dem Wildtyp als auch bei der 8bp-Deletion konnte aufgrund der spezifischen Bindung von Proteinen an die DNS eine Verzögerung der Laufeigenschaft beobachtet werden (Abb. 4.5). Die Stärken der Banden, welche bei dem Oligonukleotid mit der 8bp-Deletion beobachtet wurden, waren jedoch stets deutlich schwächer als die Banden, die bei der Verwendung des Wildtyp Oligonukleotids beobachtet wurden. Da die 8bp-Deletion Bindungsstellen für viele Transkriptionsfaktoren betrifft (Abb. 1.2), ist es plausibel, daß diese Transkriptionsfaktoren nicht mehr oder deutlich schlechter binden können. Insgesamt konnten 5 Banden (Bs1-Bs5) beobachtet werden. Während beim Wildtyp die Banden Bs2, Bs3, Bs4 und Bs5 auftraten, zeigten sich bei der 8bp-Deletion nur die Banden Bs1, Bs2 und Bs5 (Abb. 4.5).

Grund für die in Reporterergenassays beobachtete erhöhte Aktivität des HBV-Enhancer II/Core-Promotors bei Konstrukten mit der 8bp-Deletion (Fischer, 2000; Schmidt, 1999) könnte zum einen der Wegfall einer Bindungsstelle für einen Repressor, oder aber das Entstehen einer neuen Bindungsstelle für einen aktivierenden Transkriptionsfaktor sein. Ein Fehlen der Banden Bs3 und Bs4 bei dem Oligonukleotid mit der 8bp-Deletion könnte somit eine Folge des Wegfallens einer Bindungsstelle für einen Repressor sein. Die Tatsache, daß im Bereich des durch die 8bp-Deletion betroffenen NRREs die Bindung einer ganzen Reihe von Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie beschrieben wurden (Yu and Mertz, 1996; Yu and Mertz, 1997), und diese sowohl einen reprimierenden als auch aktivierenden Einfluß auf Regulationselemente ausüben (Burcin et al., 1994; Gronemeyer and Moras, 1995; Mangelsdorf et al., 1995; Tsai and Tsai, 1997), macht eine genaue Identifikation besonders schwierig. Außerdem kommt hinzu, daß die in diesem Bereich bindende Transkriptionsfaktoren bisher nicht systematisch untersucht wurden. Es wurden nur verschiedene, in den untersuchenden Laboren

vorhandene *in vitro* translatierte Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie auf Bindung an diese Sequenz untersucht. Es ist bisher nicht bekannt, welcher Faktor *in vivo* in diesem Bereich bindet.



**Abb. 5.2: Schema einer COUP-TF1 vermittelten Repression (Leng et al., 1996; Shibata et al., 1997).** Dargestellt ist das NRRE (Yu and Mertz, 2001) mit stromabwärts gelegener „TATA“-Box im Bereich des HBV-Enhancer II/Core-Promotors. A) Passive über einen Korepressor vermittelte Repression (Burke and Baniahmad, 2000). B) „Quenching“ Repression einer Aktivator abhängigen Transaktivierung. C) Aktive Repression über TFIIIB (Baniahmad et al., 1993; Fondell et al., 1993). Rot: COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor). Blau: HNF-4 (hepatocyte nuclear factor). Gelb: unbekannter Korepressor. LBD (Liganden Bindungs Domäne) (Casanova et al., 1994). BTF Basale Transkriptions Faktoren.

Ein möglicher Repressor könnte z.B der ubiquitär exprimierte COUP-TF1 (chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor) sein. Die COUP-

Transkriptionsfaktoren (COUP-TF) spielen eine bedeutende Rolle in der Regulation der embryonalen Organentwicklung, der neuronalen Entwicklung und der zellulären Differenzierung (Leng et al., 1996). Sie bewirken die Repression einer Reihe von Genen (Shibata et al., 1997). Die COUP-TFs gehören zu den Steroid/Thyroid-Kernrezeptoren (Wang et al., 1989), welche eine Familie aus funktionell miteinander in Beziehung stehenden Transkriptionsfaktoren bilden (Wang et al., 1991). Die Steroid/Thyroid-Kernrezeptoren sind Liganden-abhängige oder -unabhängige Transkriptionsfaktoren, die sowohl Monomere, Dimere als auch Heterodimere ausbilden (Evans, 1988; O'Malley, 1990; Tsai and O'Malley, 1994). Der genaue Mechanismus, wie COUP-TFs eine Repression bewirken, ist bis heute unklar (Shibata et al., 1997). COUP-TF1 bindet bevorzugt als Dimer an das Palindrom mit der Sequenz GGTCA, getrennt durch ein Nukleotid (Cooney et al., 1992; Tsai and Tsai, 1997). In EMSAs konnte gezeigt werden, daß COUP-TF1 tatsächlich an die Nukleotide 1751-1778 im Bereich des NRREs binden kann (Raney et al., 1997). Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine Bindung von COUP-TF1 in diesem Bereich zeigen (Buckwold et al., 1997; Yu and Mertz, 1997). Ein Wegfall des stromabwärts gelegenen Hemipalindroms aufgrund der 8bp-Deletion könnte somit dazu führen, daß COUP-TF1 nicht mehr in der Lage ist, als Dimer zu binden. Dafür spricht, daß Mutationen der Positionen 1764 und 1766 dazu führen, daß COUP-TF1 nicht mehr binden kann (Yu and Mertz, 2001). Für eine Bindung durch COUP-TF1 sprechen die bei den Versuchen mit dem Oligonukleotid mit der Konsensus-Sequenz für COUP-TF1 beobachteten Banden. Auch hier konnten bei der Verwendung von Kernextrakt aus HepG2 Zellen zwei Banden in annähernd gleicher Höhe zu Bs3 und Bs4 gezeigt werden (Abb. 4.5). Eine Bindung durch *in vitro* translatiertes COUP-TF1 (Homodimer) ergab ebenfalls einen „Shift“ des Oligonukleotids mit der Konsensus-Sequenz für COUP-TF1 (Abb. 4.11). Bei dem Oligonukleotid mit der 8bp-Deletion konnte gar keine Bande beobachtet werden. Dagegen zeichnete sich bei dem Wildtyp ein ganz schwacher „Shift“ in Höhe der Bande, welche durch die Konsensus-Sequenz entstanden war ab. Ein Vergleich der Bandenhöhe, welche durch COUP-TF1 als Homodimer zustande kam, mit der Höhe der mit Kernextrakt aus HepG2 Zellen erzielten Banden Bs3 und Bs4 zeigte jedoch keine Übereinstimmung. Da COUP-TF1 sowohl Homo- als auch Heterodimere ausbilden kann (Leng et al., 1996; Shibata et al., 1997), könnten die mit Kernextrakt beobachteten Banden auch durch Heterodimere hervorgerufen werden. Eine Möglichkeit wäre, daß COUP-TF1 hier

mittels eines Korepressors (Burke and Baniahmad, 2000) eine passive Repression des HBV-Enhancer II/Core-Promotors bewirkt (Abb. 5.2: A). Dafür spricht, daß sowohl für COUP-TFs als auch für andere Kernrezeptoren Korepressoren identifiziert wurden (Horwitz et al., 1996; Shibata et al., 1997). Eine weitere Möglichkeit wäre, daß COUP-TF1 als Heterodimer durch die Bindung eines anderen Mitglieds der Kernrezeptorfamilie eine Repression bewirkt. *In vivo* konnte gezeigt werden, daß COUP-TFs in der Lage sind, über ihre LBD (ligand binding domain) Heterodimere auszubilden (Casanova et al., 1994). Hierbei wird postuliert, daß bei einer Heterodimerisierung über die LBD eine allosterische Modulation vermittelt wird, welche zu einer transkriptionellen Suppression führt (Leng et al., 1996). Demnach könnte COUP-TF1 über die LBD eine Aktivator abhängige Transaktivierung (Quenching) reprimieren (Abb. 5.2. B). Ein möglicher Kandidat für eine Heterodimerisierung wäre der hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). Eine Bindung von HNF-4 im Bereich der 8bp-Deletion des Enhancer II/Core-Promotors konnte gezeigt werden (Raney et al., 1997). HNF-4 ist ein leberspezifischer Transkriptionsfaktor und gehört wie COUP-TF1 zur Familie der Steroid/Thyroid-Kernrezeptoren (Yu and Mertz, 1997). Er spielt eine übergeordnete Rolle bei der Regulation von Promotoren einer großen Anzahl leberspezifischer Gene (Sladek, 1994; Sladek et al., 1990). Die meisten der Promotorelemente, mit denen HNF-4 interagiert, werden außerdem von COUP-TFs erkannt (Ktistaki and Talianidis, 1997). Auch Ktistaki und Talianidis (1997) konnten zeigen, daß COUP-TFs eine HNF-4 vermittelte Transkription reprimieren können. Demnach könnte COUP-TF1 als Heterodimer mit HNF-4 an das NRRE binden und über die stromabwärts gelegene TATA-Box eine aktive Repression bewirken (Abb. 5.2. C). Die Repression könnte hier über TFIIB vermittelt werden, da *in vitro* eine Interaktion von COUP-TFs mit TFIIB gezeigt werden konnte (Ing et al., 1992; Tsai et al., 1987). Es wird postuliert, daß COUP-TFs über eine Protein-Protein Interaktion TFIIB inaktivieren und dadurch die basale Transkription blockieren (Baniahmad et al., 1993; Fondell et al., 1993).

Die Bande Bs1, welche nur bei dem Oligonukleotid mit der 8bp-Deletion auftrat, könnte durch die zusätzliche Bindung eines Transkriptionsfaktors aufgrund einer neu entstandenen Bindungsstelle im Bereich der 8bp-Deletion zustande kommen. Hierbei könnte es sich um den hepatocyte nuclear factor 1 (HNF-1) (Baltimore et al., 1985) handeln. Günther et al. (1996) fanden experimentelle Hinweise, daß im Serum immunsupprimierter Patienten HBV-Varianten auftraten, bei welchen aufgrund einer

Deletion der Basen 1763-1770 und Punktmutationen im Enhancer II/Core-Promotor Bereich eine neue Bindungsstelle für HNF-1 entstanden war. Auch bei der von Repp et al. (1992) beschriebenen Deletion könnte aufgrund der fehlenden 8 Basenpaare eine neue Bindungsstelle entstanden sein, welche in 10 von 14bp eine Homologie mit der HNF-1 Konsensus-Sequenz GTTAATNATTAAC (Courtoise et al., 1988) aufweist. Für HNF-1 sprechen auch die gewonnenen Ergebnisse aus den Versuchen zur Identifikation einer stromabwärts der 8bp-Deletion gelegenen Bindungsstelle für die Mitglieder der Steroid/Thyroid-Kernrezeptorfamilie (Kapitel 4.4). Tsai et al. (1997) konnten zeigen, daß die Basenfolge GG essentiell für die Bindung durch die Transkriptionsfaktoren der Kernrezeptorfamilie ist. Durch eine Mutation der Basenfolge von GN nach AA kann eine Bindung nicht mehr stattfinden. Bei allen eingefügten Mutationen (gg1-gg4, siehe Abb. 4.8) führte nur der Basenaustausch an der Stelle gg1 der 8bp-Deletion zu einem veränderten Bandenmuster, nämlich dem Wegfall der Bande Bs1 (Abb. 4.9). Auch die anschließend durchgeführten Doppelmutationen (Abb. 4.10) führten nur in Verbindung mit der Mutation an der Stelle gg1 zu einem Wegfall der Bande Bs1. Da die Mutation auch im Bereich der durch die 8bp-Deletion entstandenen Bindungsstelle für HNF-1 liegt (Abb. 5.3), könnte sie hier eine Bindung von HNF-1 verhindern und somit zum Wegfall der Bande Bs1 führen.



**Abb. 5.3: Vergleich der DNS Sequenz für die 8bp-Deletion mit der HNF-1 Konsensus-Sequenz.** Dargestellt ist ein Vergleich der Sequenz des durch die 8bp-Deletion veränderten NRREs (nuclear receptor response element) und der HNF-1 Konsensus-Sequenz. A) 8bp-Deletion (nt 1763-1770) (Repp et al., 1992). B) 8bp-Deletion mit Mutation an der Stelle gg1 GN→AA (Mutationen die zum Wegfall einer Bindung durch Androgen-, Oestrogen- und Thyroid-Rezeptoren führen, Katalog 2000, Santa Cruz Biotechnologie, Heidelberg). C) HNF-1 Konsensus Sequenz (Courtoise et al., 1988).

Gegen eine Bindung von HNF-1 sprechen die von S. Fischer gefundenen Daten (Fischer, 2000). Hier konnte in keinem der durchgeführten EMSAs mit Kernextrakten aus HepG2 Zellen durch die spezifische Bindung eines Proteins eine Verzögerung



der Laufeigenschaft des Oligonukleotids mit der 8bp-Deletion beobachtet werden. Außerdem konnte durch HNF-1 Expressionsvektoren keine Aktivierung eines Enhancer II Reportergenkonstruktes gezeigt werden (Fischer, 2000). In anschließenden Kompetitionsversuchen mit radioaktiv markiertem HNF-1-Konsensus Oligonukleotid und nicht markiertem 8bp Oligonukleotid konnte jedoch beobachtet werden, daß das Varianten Oligonukleotid mit einer Bindung von HNF-1 an das markierte Konsensus Oligonukleotid kompetiert. Die Tatsache, daß eine Kompetition jedoch erst bei einem Überschuß von 1:50 zustande kam, sprach für eine eher schwache Bindung durch HNF-1. Auch die mit dem Kernextrakt beim Wildtyp Oligonukleotid beobachtete sehr schwache Bande spricht für eine allgemein schwache Bindung durch die im Kernextrakt enthaltenen Transkriptionsfaktoren (Fischer, 2000). Aufgrund der nicht ganz eindeutigen Ergebnisse von S. Fischer wurden die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit mit den gleichen Oligonukleotiden (nt 1756-1780) für die 8bp-Deletion und den Wildtyp, jedoch mit neu hergestelltem Kernextrakt aus HepG2 Zellen, wiederholt. Generell läßt sich sagen, daß für beide Oligonukleotide aufgrund der spezifischen Bindung von Proteinen an die DNS eine Verzögerung der Laufeigenschaft gezeigt werden konnte (Abb. 4.6). Beim Wildtyp konnten fünf Banden (Bs1-5) identifiziert werden. Bei der Variante traten drei Banden auf (Bs2, Bs4 und Bs5). Eine zusätzliche Bande Bs1 durch HNF-1 konnte jedoch auch hier nicht eindeutig nachgewiesen werden, da diese durch die starke Bande Bs2 überschattet wurde. Erstaunlicherweise trat hier jedoch die bisher nur beim Wildtyp beobachtete Bande Bs4 auf. Gegen eine neue Bindungsstelle für HNF-1 aufgrund der 8bp-Deletion sprach die beim Wildtyp beobachtete zusätzlich Bande Bs1. HNF-1 spielt eine wichtige Rolle in der Regulation des hepatozytischen Phänotyps. Früher wurde sogar angenommen, daß er eine übergeordnete Rolle in der Regulation der Expression anderer Transkriptionsfaktoren spielt (Mendel and Crabtree, 1991). Hierbei bindet HNF-1 als Homodimer an seine Zielsequenzen (Frain et al., 1989). Während Günther et al. (1996) postulieren, daß HNF-1 hier als Transkriptionsaktivator wirkt, konnte S. Fischer (2000) in Reportergenassays keine Aktivierung durch HNF-1 nachweisen. Günther et al. (1996b) zeigten für die von ihnen untersuchten Varianten aus Seren von immunsupprimierten Patienten eine gesteigerte Replikation. Im immunsupprimierten Organismus unterliegt das Virus einem geringeren Eliminationsdruck durch das Immunsystem, so daß 8bp-Deletions- und HNF-1-

Varianten hier aufgrund ihrer gesteigerten Replikation einen Selektionsvorteil haben (Günther et al., 1996b). Auch für die von Repp et al. beschriebene Deletion an Position 1763-1770 wurde eine Zunahme an HBV-DNS-Expression und eine Abnahme der präC-mRNS und des HBe/HBcAg-Verhältnisses beschrieben (Scaglioni et al., 1997). Bei immunsupprimierten Patienten scheint die Akkumulation einer HNF-1 Insertionsvariante mit einem schnelleren Fortschreiten der Leberzerstörung einherzugehen (Pult et al., 1997). Die HNF-1 Insertionsvariante ist eine Variante, bei der es zu einer Insertion der HNF-1 Bindungsstelle aus dem LHBs-Promotor in den Enhancer II kommt (Pult et al., 1997). Denkbar wäre, daß aufgrund der Anwendung von immunsuppressiven Medikamenten, speziell Glukokortikoide die HNF-1 Varianten eine erhöhte Replikation bzw. Genexpression aufweisen und es daraufhin zu einer intrazellulären Akkumulation der gebildeten Virusproteine kommt (Lau et al., 1992; McMillan et al., 1995). Dies könnte zu einem direkten zytopathischen Effekt führen (Roingeard et al., 1990) oder für Zytokine sensibilisieren (Gilles et al., 1992; Nakamoto et al., 1997).

Für HNF-1 als Transkriptionsaktivator sprechen auch die Befunde von Ueda et al. über den Enhancer II des Woodchuck Hepatitis Virus (WHV), einem nahen Verwandten des HBV. Auch beim WHV spielt der Enhancer II eine zentrale Rolle bei der Virusreplikation (Ueda et al., 1996). Er scheint verantwortlich für die hohe Replikationsrate des WHV (Schaefer et al., 1998b). Innerhalb des WHV-Enhancers II konnte ebenfalls eine Bindungsstelle für HNF-1 identifiziert werden (Dr. T. Tolle, Dr. H. Stumpf persönliche Mitteilung) (Ueda et al., 1996). Vergleicht man die Lage der HNF-1 Bindungsstelle im Enhancer II des WHV mit der Lage der durch die 8bp-Deletion innerhalb des HBV-Enhancer II/Core-Promotors neu entstandenen Bindungsstelle für HNF-1, so lassen sich Übereinstimmungen erkennen (Dr. T. Tolle, Dr. H. Stumpf persönliche Mitteilung). In transienten Reporterassays mit WHV-Deletionsmutanten innerhalb der Bindungsstelle für HNF-1 konnte eine deutliche Reduktion der Enhanceraktivität gezeigt werden (Ueda et al., 1996). Auch bei anschließenden *in vivo* Versuchen mit WHV ergab sich, daß HNF-1 essentiell für die Enhancer II Aktivität ist, da Virus ohne HNF-1 Bindungsstelle nahezu keine Infektiosität aufwies (Ueda et al., 1998).

Die durchgeführte DNase I Footprint Analyse unterstützt beide Hypothesen. Nach DNase I-Verdau ist beim Wildtyp innerhalb des NRREs (nuclear receptor response element) ein geschützter Bereich zu erkennen (Abb. 4.12), der auf einer Bindung

durch z.B. COUP-TF1, HNF-4 oder irgendeinem anderen der potentiellen Transkriptionsfaktoren beruhen könnte. Bei der 8bp-Deletion sieht dieser Bereich deutlich anders aus (Abb. 4.12). Auch hier ist allerdings mindestens ein Bereich geschützt. Ob dieser Schutz nach dem DNase I Verdau auf einer Bindung durch HNF-1 oder COUP-TF1 beruht, kann durch diesen Versuchsansatz nicht geklärt werden.

Mittlerweile wurde begonnen, die im Bereich des NRREs bindenden Transkriptionsfaktoren genauer zu charakterisieren. Bei einer ersten Affinitätschromatographie mit den entsprechenden Bindungsbereichen für den Wildtyp bzw. die 8bp-Deletion konnten wahrscheinlich nur unspezifische ubiquitär exprimierte Proteine identifiziert werden. Zumindest zwei der eindeutig durch Peptid Massenfingerprint Analyse identifizierten Proteine sind abundante ubiquitäre Proteine ( $\beta$ -Actin, hsp 90). Die Wildtyp Banden 3, 4, 6, 8, 9 (Abb. 4.13) sollen noch sequenziert werden, da die im PAGE bestimmten Molekülmassen in einem Bereich liegen, welcher dem der Faktoren (HNF-4, COUP-TF1, PPAR) entspräche.

Auch sollen unspezifisch bindende Proteine durch Absorption an ein Oligonukleotid mit einer Zufallssequenz, die eine zur HBV-Wildtyp Sequenz identische Basenzusammensetzung aufweist, eliminiert werden. Ein erster Versuchsansatz (Abb. 4.15) verbesserte das Ergebnis aber nur unwesentlich. Interessanterweise zeigte sich in allen Versuchen zur Isolation der an das Wildtyp- und das 8bp-NRRE bindenden Kernproteine, daß das Wildtyp Oligonukleotid deutlich mehr Protein als das 8bp Oligonukleotid band. Dies unterstützt zum einen die Ergebnisse der EMSAs, in denen die 8bp Oligonukleotide auch schwächere Bandshifts zeigten, zum anderen deutet es doch auf eine Bindung für exakt diese Sequenz spezifischen Faktoren hin. Somit besteht die Aussicht, daß die veranlaßte, aber noch nicht durchgeführte Sequenzierung der Banden 3, 4, 6, 8, 9 (Abb. 4.13) *in vivo* bindende Mitglieder der Kernrezeptorfamilie identifiziert.

## 6 Zusammenfassung

In dieser Arbeit gelang der Nachweis, daß stabil in Hepatozytenlinien exprimiertes Hepatitis B Virus X Protein in funktioneller Form exprimiert wird. Hierbei entsprach die Expression des HBx weitestgehend der in chronisch HBV-infizierter Leber vorgefundenen Situation. In diesen Zelllinien wurde durch UV-Bestrahlung die p53-Expression aktiviert. Somit konnte unter weitgehend natürlichen Expressionsbedingungen, sowohl für HBx als auch für p53, gezeigt werden, daß HBx mehrere Funktionen von p53 beeinflusst. In stabil HBx exprimierenden AML12 Zellen konnte gezeigt werden, daß HBx in der Lage war, einer p53-vermittelten Repression des HBV-Enhancer I entgegen zu wirken. Die Zellen waren mit einem Reportergenkonstrukt, unter Kontrolle des HBV-Enhancers I, transfiziert worden. Anschließend wurde die p53-Expression durch eine Bestrahlung mit UV-Licht verschiedener Stärke induziert. Bei einer Bestrahlung mit 40 Joule/m<sup>2</sup>, welche zu einer maximalen Expression von p53 führte, war die exprimierte Menge an Reporter-Protein in den HBx exprimierenden Zellen 5 mal höher als in der Ausgangszelllinie. Des Weiteren konnte gezeigt werden, daß HBx einen Einfluß auf die p53-vermittelte Transkription von p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS hat. Hierzu wurde neben den bereits verwendeten AML12 Zellen noch die humane stabil HBx exprimierende Zelllinie HepG2-CMVX8 und als Kontrollzelllinie HepG2-CMVXM2 verwendet. Die Zellen wurden ebenfalls mit UV-Licht verschiedener Dosis bestrahlt. Es zeigte sich, daß sowohl in der stabil HBx exprimierenden Zelllinie HepG2-CMVX8, als auch in den Kontrollzellen HepG2-CMVXM2 und in den AML12 Zellen die Menge an gebildeter p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS bis zu einem Maximum bei 20 bis 30 Joule/m<sup>2</sup> anstieg und bei einer höheren Dosis wieder abfiel. Im Vergleich dazu konnte in HBx exprimierenden AML12-HBx9 Zellen ein kontinuierlicher Anstieg der p21<sup>waf/cip/sdi</sup>-RNS auch bei einer höheren Dosis beobachtet werden.

Ein weiterer Gegenstand dieser Arbeit war eine häufig in bestimmten Patientengruppen gefundene 8bp-Deletion der Nukleotide 1763-1770 im Bereich des HBV-Enhancer II/Core-Promotors. Hierbei wurde der Einfluß auf das von der 8bp-Deletion betroffene NRRE (nuclear receptor responsible element) bzw. die in diesem Bereich bindenden Transkriptionsfaktoren untersucht. Aus Untersuchungen anderer Gruppen war bekannt, daß aufgrund von Mutationen innerhalb des Enhancer II/Core-Promotors Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren entstehen oder

wegfallen können. Bei den mit Kernextrakten aus HepG2 Zellen durchgeführten EMSAs, und auch bei anschließend durchgeführten Affinitätschromatographie zeigte sich, daß Oligonukleotide mit der 8bp-Deletion im Vergleich zum Wildtyp weniger Kernproteine banden. Es zeigte sich, daß *in vitro* translatiertes COUP-TF1 nur sehr schwach an das wt-NRRE band und keine Bindung von COUP-TF1 an das NRRE mit 8bp-Deletion festzustellen war. Die Ergebnisse deuten daraufhin, daß es sich hierbei um eine Bindung durch COUP-TF1 als Heterodimer handeln könnte.

Ein Vergleich der bei den EMSAs beobachteten Banden ergab neben dem Wegfall zweier Banden, welche beim Wildtyp auftraten, eine zusätzliche neue Bande bei der Variante. Das Fehlen der zwei Banden spricht für den Wegfall einer Bindung durch einen reprimierenden Faktor, z.B. COUP-TF1. Die zusätzlich beobachtete Bande bei der 8bp-Deletion steht im Einklang mit den Ergebnissen einer schwachen Bindung durch HNF-1. Eine Sequenzierung der affinitätsgereinigten Proteine ist veranlaßt, das Ergebnis steht noch aus.

## 7 Literaturverzeichnis

- Aden, D. P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B. B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line., *Nature* 282, 615-6.
- Akagi, T., Ono, H., and Shimotohno, K. (1996). Expression of cell-cycle regulatory genes in HTLV-I infected T-cell lines: Possible involvement of Tax1 in the altered expression of cyclin D2, p18ink4 and p21Waf1/Cip1/Sdi1., *Oncogene* 12, 1645- 1652.
- Albin, C., and Robinson, W. S. (1980). Protein kinase activity in hepatitis B virus., *J Virol* 34, 297-302.
- Antunovic, J., Lemieux, N., and Cromlish, J. A. (1993). The 17 kDa HBx protein encoded by hepatitis B virus interacts with the activation domains of Oct-1, and functions as a coactivator in the activation and repression of a human U6 promoter., *Cell Mol Biol Res* 39, 463-82.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. A., and Struhl, K., eds. (1998). *Current Protocols in Molecular Biology* (John Wiley & Sons, Inc.).
- Bahn, A., Gerner, P., Martine, U., Bortolotti, F., and Wirth, S. (1997). Detection of different viral strains of hepatitis B virus in chronically infected children after seroconversion from HBsAg to anti-HBs indicating viral persistence., *J Hepatol* 27, 973-978.
- Balsano, C., Avantaggiati, M. L., Natoli, G., De Marzio, E., Will, H., Perricaudet, M., and Levrero, M. (1991). Full-length and truncated versions of the hepatitis B virus (HBV) X protein (pX) transactivate the cmc protooncogene at the transcriptional level., *Biochem Biophys Res Commun* 176, 985-92.
- Balsano, C., Billet, O., Bennoun, M., Cavard, C., Zider, A., Grimber, G., Natoli, G., Briand, P., and Levrero, M. (1994). Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator in vivo., *J Hepatol* 1, 103-9.
- Baltimore, D., Grosschedl, R., Weaver, D., Constantin, F., and Imanihi-Kari, T. (1985). *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 50, 417-420.

- Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1993). Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factors TFIIB may mediate target gene depression and activation by thyroid hormone., *Proc Natl Acad Sci USA* 90, 8832-8836.
- Barnabas, S., Hai, T., and Andrisani, O. M. (1997). The hepatitis B virus X protein enhances the DNA binding potential and transcription efficacy of bZip transcription factors., *J Biol Chem* 272, 20684-90.
- Beasley, R. P., Hwang, L. Y., Lin, C. C., and Chien, C. S. (1981). Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus. A prospective study of 22 707 men in Taiwan., *Lancet* 2, 1129-33.
- Ben-Levy, R., Faktor, O., Berger, I., and Shaul, Y. (1989). Cellular factors that interact with the hepatitis B virus enhancer., *Mol Cell Biol* 9, 1804-1809.
- Benn, J., and Schneider, R. J. (1994). Hepatitis B virus HBx protein activates Ras-GTP complex formation and establishes a Ras, Raf, MAP kinase signaling cascade., *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 10350-4.
- Benn, J., and Schneider, R. J. (1995). Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls., *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 11215-9.
- Bergametti, F., Prigent, S., Lubet, B., Benoit, A., Tiollais, P., Sarasin, A., and Transy, C. (1999). The proapoptotic effect of hepatitis B virus HBx protein correlates with its transactivation activity in stably transfected cell lines., *Oncogene* 18, 2860-2871.
- Birnboim, H. C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA., *Nucl Acid Res* 7, 1513-1523.
- Blum, H. E., Zhang, Z. S., Galun, E., von Weizsäcker, F., Garner, B., Liang, T. J., and Wands, J. R. (1992). Hepatitis B virus X protein is not central to the viral life cycle in vitro., *J Virol* 66, 1223-7.
- Bock, C. T., Tillmann, H. L., Maschek, H. J., Manns, M. P., and Trautwein, C. (1997). A PreS mutation isolated from a patient with chronic hepatitis B infection leads to virus retention and misassembly., *Gastroenterology* 113, 1976-82.
- Böttcher, B., Wynne, S. A., and Crowther, R. A. (1997). Determination of the fold of the core protein of hepatitis B virus by electron cryomicroscopy, *Nature* 386, 88-91.

- Breidbart, S., Burk, R. D., and Saenger, P. (1993). Hormonal Regulation of Hepatitis B Virus Gene Expression: Influence of Androgen Receptor., *Pediatric Research* 34, 300-302.
- Brind, A., Jiang, J., Samuel, D., Gigou, M., Feray, C., Bréchet, C., and Kremsdorf, D. (1997). Evidence for selection of hepatitis B mutants after liver transplantation through peripheral blood mononuclear cell infection., *J Hepatol* 26, 228-35.
- Bruß, V., and Gerlich, W. H. (1988). Formation of transmembraneous hepatitis B e-antigen by cotranslational in vitro processing of the viral precore protein., *Virology* 163, 268-75.
- Buckwold, V. E., Xu, Z., Chen, M., Yen, T. S., and Ou, J. H. (1996). Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication., *J Virol* 70, 5845-51.
- Buckwold, V. E., Xu, Z., Yen, T. S., and Ou, J. H. (1997). Effects of a frequent double-nucleotide basal core promoter mutation and its putative single-nucleotide precursor mutations on hepatitis B virus gene expression and replication., *J Gen Virol* 78, 2055-65.
- Burcin, M., Kohne, A. C., Runge, D., Steiner, C., and Renkawitz, R. (1994). Factors influencing nuclear receptors in transcriptional repression., *Semin Cancer Biol* 5, 337-46.
- Burke, L. J., and Baniahmad, A. (2000). Co-repressors 2000, *FASEB J* 14, 1876-1888.
- Butel, J. S. (2000). Viral Carcinogenesis: revelation of molecular mechanisms and etiology of human disease., *Carcinogenesis* 21, 405- 426.
- Butz, K., Geisen, C., Ullmann, A., Zentgraf, H., and Hoppe-Seyler, F. (1998). Uncoupling of p21WAF1/CIP1/SDI1 mRNA and protein expression upon genotoxic stress., *Oncogene* 17, 781-7.
- Carman, W. F. (1997). The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus., *J Viral Hepat* 1, 11-20.
- Casanova, J., Helmer, E., Selmi-Ruby, S., Oi, J. S., Au-Fliegner, M., Desai-Yajmih, V., Koudinova, N., Yarm, F., Raaha, B. M., and Samuels, H. H. (1994). Functional evidence for ligand-dependent dissociation of thyroid hormone and retinoic acid receptors from an inhibitory cellular factor., *Mol Cell Biol* 14, 5756-5765.



- Cereseto, A., Diella, F., Mulloy, J. C., Cara, A., Michieli, P., Grassmann, R., Franchini, G., and Klotman, M. E. (1996). p53 functional impairment and high p21waf1/cip1 expression in human T-cell lymphotropic/leukemia virus type I-transformed T cells., *Blood* 88, 1551- 1560.
- Chang, S. F., Netter, H. J., Bruns, M., Schneider, R., Fröhlich, K., and Will, H. (1999). A new avian hepadnavirus infecting snow geese (*Anser caerulescens*) produces a significant fraction of virions containing single-stranded DNA., *Virology* 262, 39-54.
- Chen, H. S., Kaneko, S., Girones, R., Anderson, R. W., Hornbuckle, W. E., Tennant, B. C., Cote, P. J., Gerin, J. L., Purcell, R. H., and Miller, R. H. (1993). The woodchuck hepatitis virus X gene is important for establishment of virus infection in woodchucks., *J Virol* 67, 1218-26.
- Chen, I.-H., Huang, C. J., and Ting, L. P. (1995). Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promotor of hepatitis B virus., *J Virol* 69, 3647-3657.
- Chen, X., Ko, L. J., Jayaraman, L., and Prives, C. (1996). p53 levels, functional domains, and DNA damage determine the extent of the apoptotic response of tumor cells., *Genes and Development* 10, 2438- 2451.
- Cheong, J. H., Yi, M., Lin, Y., and Murakami, S. (1995). Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation., *EMBO J* 14, 143-50.
- Chirillo, P., Pagano, S., Natoli, G., Puri, P. L., Burgio, V. L., Balsano, C., and Levrero, M. (1997). The hepatitis B virus X gene induces p53-mediated programmed cell death., *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8162- 8167.
- Choi, C. Y., Choi, B. H., Park, G. T., and Rho, H. M. (1997). Activating transcription factor 2 (ATF2) down-regulates hepatitis B virus X promoter activity by the competition for the activating protein 1 binding site and the formation of the ATF2-Jun heterodimer., *J Biol Chem* 272, 16934-9.
- Chou, C., Wang, L., Lin, H., and Chi, C. (1992). Glucocorticoid stimulates hepatitis B viral gene Expression in cultured human hepatoma cels., *Hepatology* 16, 13-18.
- Concen, S. D., and Cole, C. N. (1994). The transforming proteins of simian virus 40., *Seminars in Virologie* 5, 349-356.
- Conway, J. F., Cheng, N., Zlotnick, A., Wingfield, P. T., Stahl, S. J., and Steven, A. C. (1997). Visualization of a 4-helix bundle in the hepatitis B virus capsid by cryo-electron microscopy., *Nature* 386, 91-4.

- Cooney, A. J., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1992). Chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor (COUP-TF) binds to different GGTC A response elements, allowing COUP-TF to repress hormonal induction of the vitamin D<sub>3</sub>, Thyroid hormone, and retinoic acid receptors., *Mol Cell Biol* 12(9), 4153-4163.
- Courtoise, G., Baumhueter, S., and Crabtree, G. R. (1988). Purified hepatocyte nuclear factor 1 interacts with a family of hepatocyte-specific promoters., *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 7937-7941.
- Crowther, R. A., Kiselev, N. A., Bottcher, B., Berriman, J. A., Borisova, G. P., Ose, V., and Pumpens, P. (1994). Three-dimensional structure of hepatitis B virus core particles determined by electron cryomicroscopy., *Cell* 77, 943-50.
- Dandri, M., Schirmacher, P., and Rogler, C. E. (1996). Woodchuck Hepatitis Virus X Protein is Present in Chronically Infected Liver and Woodchuck Hepatocellular Carcinomas Which Are Permissive for Viral Replication., *J Virol* 70, 5246-5254.
- Dane, D. S., Cameron, C. H., and Briggs, M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen- associated hepatitis., *Lancet* 1, 695-8.
- de Wet, J. R., Wood, K. V., DeLuca, M., Helinski, D. R., and Subramani, S. (1987). Firefly luciferase gene: structure and expression in mammalian cells., *Mol Cell Biol* 2, 725-737.
- Diao, J., Khine, A. A., Sarangi, F., Hsu, E., Iorio, C., Tibbles, L. A., Woodgett, J. R., Penninger, J., and Richardson, C. D. (2001). X protein of hepatitis B virus inhibits Fas-mediated apoptosis and is associated with up-regulation of the SAPK/JNK pathway., *J Biol Chem* 276, 8328-40.
- Dienes, H. P., Gerken, G., Goergen, B., Heermann, K., Gerlich, W. H., and Meyer zum Büschenfelde, K. H. (1995). Analyses of the precore DNA sequence and detection of precore antigen in liver specimens from patients with anti-hepatitis B e-positive chronic hepatitis., *Hepatology* 21, 1-7.
- Doitsh, G., and Shaul, Y. (1999). HBV transcription repression in response to genotoxic stress is p53- dependent and abrogated by pX., *Oncogene* 18, 7506-13.
- Doo, E., and Liang, T. J. (2001). Molecular Anatomy and Pathophysiologic Implications of Drug Resistance in Hepatitis B Virus Infection, *Gastroenterology* 120, 1000-1008.

- Doria, M., Klein, N., Lucito, R., and Schneider, R. J. (1995). The hepatitis B virus HBx protein is a dual specificity cytoplasmic activator of Ras and nuclear activator of transcription factors., *Embo J* 14, 4747-57.
- el Deiry, W. S., Tokino, T., Velculescu, V. E., Levy, D. B., Parsons, R., Trent, J. M., Lin, D., Mercer, W. E., Kinzler, W., and Vogelstein, B. (1993). WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression., *Cell* 75, 817-25.
- el Deiry, W. S., Tokino, T., Waldman, T., Oliner, J. D., Velculescu, V. E., Burrell, M., Hill, D. E., Healy, E., Rees, J. L., Hamilton, S. R., *et al.* (1995). Topological control of p21WAF1/CIP1 expression in normal and neoplastic tissues., *Cancer Res* 55, 2910-9.
- Elmore, L. W., Hancock, A. R., Chang, S. F., Wang, X. W., Chang, S., Callahan, C. P., Geller, D. A., Will, H., and Harris, C. C. (1997). Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis., *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 14707-12.
- Evans, R. M. (1988). The steroid and Thyroid hormon receptor superfamily., *Science* 240, 889-895.
- Faktor, O., and Shaul, Y. (1990). The identification of hepatitis B virus X gene responsive elements reveals functional similarity of X and HTLV-I tax., *Oncogene* 5, 867- 872.
- Farza, H., Salmon, A. M., Hadchouel, M., Moreau, J. L., Babinet, C., Tiollais, P., and Pourcel, C. (1987). Hepatitis B surface antigen gene expression is regulated by sex steroids and glucocorticoids in transgenic mice., *Proc Natl Acad Sci USA* 84, 1187-91.
- Feinberg, A. P., and Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity., *Anal Biochem* 132, 6-13.
- Feitelson, M. A., Zhu, M., Duan, L. X., and London, W. T. (1993). Hepatitis B x antigen and p53 are associated in vitro and in liver tissues from patients with primary hepatocellular carcinoma., *Oncogene* 8, 1109-17.
- Fiedler, N. (1996) Kombiniertes Effekt des Hepatitis B Virus X Proteins und des Tumorsuppressorproteins p53 auf virale und zelluläre Promotoren., Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen.

- Fiedler, N., Quant, E., Fink, L., Schuster, R., Gerlich, W. H., and Schaefer, S. (in Vorbereitung). Stable expression of Hepatitis B Virus X Protein in hepatocyte lines has differential effects on apoptosis.
- Fink, L. J. (1997) Einfluß des Hepatitis-B-Virus X-Proteins auf Regulation und Funktion des Tumorsuppressorproteins p53., Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen, Gießen.
- Fischer, S. F. (2000) Veränderte Transkriptionsregulation des Hepatitis B Virus bei einer Variante mit einer 8-basenpaar-deletion im Core-Promotor., Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Fondell, J. D., Roy, A. L., and Roeder, R. G. (1993). Unliganded thyroid hormone receptor inhibits formation of a functional preinitiation complex: implications for active repression., *Genes Dev* 7, 1400-1410.
- Frain, M., Swart, G., Monaci, P., Nicosia, A., Stämpfli, S., Frank, R., and Cortese, R. (1989). The liver-specific transcription factor LF-B1 contains a highly diverged homeobox DND binding domain., *Cell* 59, 145-157.
- Galibert, F., Mandart, E., Fitoussi, F., Tiollais, P., and Charnay, P. (1979). Nucleotide sequence of the hepatitis B virus genome (subtype ayw) cloned in *E. coli*., *Nature* 281, 646-50.
- Gerlich, W. H., Goldmann, U., Muller, R., Stibbe, W., and Wolff, W. (1982). Specificity and localization of the hepatitis B virus-associated protein kinase, *J Virol* 42, 761-6.
- Gerlich, W. H., and Robinson, W. S. (1980). Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' terminus of its complete DNA strand., *Cell* 21, 801-9.
- Gerner, P., Lausch, E., Tratzmuller, R., Spangenberg, C., and Wirth, S. (1999). Hepatitis B virus core promotor mutations in children with multiple anti-HBe/HBeAg reactivations result in enhanced promotor activity., *J Med Virol* 59, 415-23.
- Gerner, P. H., Friedt, M., Oettinger, R., Lausch, E., and Wirth, S. (1998). The hepatitis B virus seroconversion to anti-HBe is frequently associated with HBV genotype changes and selection of preS2-defective particles in chronically infected children., *Virology* 245, 163-172.

- Gilbert, S., Galarneau, L., Lamontagne, A., Roy, S., and Bélanger, L. (2000). The Hepatitis B Virus Core Promotor Is Strongly Activated by the Liver Nuclear Receptor Fetoprotein Transcription Factor or by Ectopically Expressed Steroidogenic Factor 1., *J Virol* 74, 5032-5039.
- Gilles, P. N., Guerrette, D. L., Ulevitch, R. J., Schreiber, R. D., and Chisari, F. V. (1992). HBsAg retention sensitizes the hepatocyte to injury by physiological concentrations of interferon-gamma., *Hepatology* 16, 655-663.
- Gottlob, K., Pagano, S., Levrero, M., and Graessmann, A. (1998). Hepatitis B virus X protein transcription activation domains are neither required nor sufficient for cell transformation., *Cancer Res* 58, 3566- 3570.
- Grethe, S., Heckel, J. O., Rietschel, W., and Hufert, F. T. (2000). Molecular epidemiology of hepatitis B virus variants in nonhuman primates., *J Virol* 74, 5377- 81.
- Gronemeyer, H., and Moras, D. (1995). Nuclear receptors. How to finger DNA., *Nature* 375(6528), 190-1.
- Guidotti, L. G., Matzke, B., Schaller, H., and Chisari, F. V. (1995). High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice., *J Virol* 69, 6158-69.
- Günther, S., Baginski, S., Kissel, H., Reinke, P., Krüger, D. H., Will, H., and Meisel, H. (1996a). Accumulation and persistence of hepatitis B virus core gene deletion mutants in renal transplant patients are associated with end-stage liver disease., *Hepatology* 24, 751-8.
- Günther, S., Fischer, L., Pult, I., Sterneck, M., and Will, H. (1999). Naturally occurring variants of hepatitis B virus., *Adv Virus Res* 52, 25- 137.
- Günther, S., Meisel, H., Reip, A., Miska, S., Krüger, D. H., and Will, H. (1992). Frequent and rapid emergence of mutated pre-C sequences in HBV from e-antigene positive carriers who seroconvert to anti-HBe during interferon treatment., *Virology* 187, 271-279.
- Günther, S., Piwon, N., Iwanska, A., Schilling, R., Meisel, H., and Will, H. (1996b). Type, prevalence, and significance of core promoter/enhancer II mutations in hepatitis B viruses from immunosuppressed patients with severe liver disease., *J Virol* 70, 8318-31.
- Guo, W., Chen, M., Yen, T. S. B., and J.-H., O. (1993). Hepatocyte-specific expression of the hepatitis B virus core promotor depends on both positiv and negative regulation., *Mol Cell Biol* 13, 443-448.

- Hall, P. A., and Lane, D. P. (1997). Tumor suppressors: a developing role for p53?, *Curr Biol* 7, R144-7.
- Hamada, T., Kumashiro, R., Koga, Y., Hino, T., and Furudera, S. (1993). Fatal acute hepatitis b virus infection while receiving immunosuppressants after renal transplantation., *Internal Medicine* 32, 547-551.
- Harrison, T. J. (1998). Genetic Variants of HBV. In *Hepatitis B Virus: Molecular Mechanism in Disease and Novel Strategies of Therapy.*, Koshy, R. and W. H. Caselmann, eds. (London, Imperial College Press.), pp. 93-110.
- Haviv, I., Matza, Y., and Shaul, Y. (1998a). pX, the HBV-encoded coactivator, suppresses the phenotypes of TBP and TAFII-250 mutants., *Genes Dev* 12, 1217-26.
- Haviv, I., Shamay, M., Doitsh, G., and Shaul, Y. (1998b). Hepatitis B virus pX targets TFIIB in transcription coactivation., *Mol Cell Biol* 18, 1562-9.
- Hildt, E., Saher, G., Bruss, V., and Hofschneider, P. H. (1996). The hepatitis B virus large surface protein (LHBs) is a transcriptional activator., *Virology* 225, 235-239.
- Hirsch, R. C., Lavine, J. E., Chang, L. J., Varmus, H. E., and Ganem, D. (1990). Polymerase gene products of hepatitis B viruses are required for genomic RNA packaging as well as for reverse transcription., *Nature* 344, 552-5.
- Horwitz, K. B., Jackson, T. A., Bain, D. L., Richter, J. K., Takimoto, G. S., and Tung, L. (1996). Nuclear receptor coactivators and corepressors., *Mol Endocrinol* 10, 1167-1177.
- Hu, K. Q., Yu, C. H., and Vierling, J. M. (1992). Up-regulation of intercellular adhesion molecule 1 transcription by hepatitis B virus X protein., *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 11441-5.
- Huang, J., and Liang, T. J. (1993). A novel hepatitis B virus (HBV) genetic element with Rev response element-like properties that is essential for expression of HBV gene products., *Mol Cell Biol* 13, 7476-86.
- Huang, Z.-M., and Yen, T. S. B. (1995). Role of the hepatitis B virus posttranscriptional regulatory element in export of intronless transcripts., *Mol Cell Biol* 15, 3864-9.
- Huang, Z.-M. and Yen, T. S. B. (1994). Hepatitis B virus RNA element that facilitates accumulation of surface gene transcripts in the cytoplasm., *J Virol* 68, 3193-9.

- Hubert, R. (2000). Experimentator: Proteinbiochemie/Proteomics (Heidelberg/Berlin, Spektrum Akademischer Verlag).
- Huibretse, J. M., and Scheffner, M. (1994). Mechanism of tumor suppressor protein inactivation by human papillomavirus E6 and E7 oncoproteins., *Seminars in Virologie* 5, 357-367.
- Ing, N. H., Beekmann, J. M., Tsai, S. Y., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1992). Members of the steroid hormone receptor superfamilie interact with TFIIB., *J Biol Chem* 267, 17617-17623.
- Ishida, H., Ueda, K., Ohkawa, K., Kanazawa, Y., Hosui, A., Nakanishi, F., Mita, E., Kasahara, A., Sasaki, Y., Hori, M., and Hayashi, N. (2000). Identifikation of Multiple Transkription factors, HLF, FTF and E4BP4., Controlling Hepatitis B Virus Enhancer II, *J Virol* 74, 1241-1251.
- Jia, L., Wang, X. W., and Harris, C. C. (1999). Hepatitis B virus X protein inhibits nucleotide excision repair., *Int J Cancer* 80, 875-9.
- Johnson, J. L., Raney, A. K., and McLachlan, A. (1995). Charakterization of a functional hepatocyte nuclear factor 3 binding site in the hepatitis B virus nucleocapsid promotor., *Virology* 208, 147-158.
- Jursch, C. A. (2000) Größenbestimmung von Viren in menschlichem Blutplasma durch Ausschlußchromatographie., Inaugural-Dissertation, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Kane, M. A. (1995). Global programme for control of hepatitis B infection., *Vaccine* 13 Suppl. 1, S47- S49.
- Kaneko, M., Uchida, T., Moriyama, M., Arakawa, Y., Shikata, T., Gotoh, K., and Mima, S. (1995). Probable implication of mutations of the X open reading frame in the onset of fulminant hepatitis B., *J Med Virol* 47, 204-8.
- Kann, M., and Gerlich, W. H. (1994). Effect of core protein phosphorylation by protein kinase C on encapsidation of RNA within core particles of hepatitis B virus., *J Virol* 68, 7993-8000.
- Kann, M., Thomssen, R., Kochel, H. G., and Gerlich, W. H. (1993). Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus., *Arch Virol Suppl* 8, 53-62.
- Kekulé, A. S., Lauer, U., Weiss, L., Lubber, B., and Hofschneider, P. H. (1993). Hepatitis B virus transactivator HBx uses a tumour promoter signalling pathway., *Nature* 361, 742-5.

- Kidd, A. H., and Kidd Ljunggren, K. (1996). A revised secondary structure model for the 3'-end of hepatitis B virus pregenomic RNA., *Nucleic Acids Res* 24, 3295-301.
- Kidd-Ljunggren, K., Öberg, M., and Kidd, A. H. (1997). Hepatitis B virus X gene 1751 to 1774 mutations: implications for HBeAg status and disease., *J General Virol* 78, 1469-1478.
- Kim, C. M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T., and Jay, G. (1991). HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice., *Nature* 351, 317-20.
- Kim, H., Lee, H., and Yun, Y. (1998). X-gene product of hepatitis B virus induces apoptosis in liver cells., *J Biol Chem* 273, 381-5.
- Kim, S. O., Park, J. G., and Lee, Y. I. (1996). Increased expression of the insulin-like growth factor I (IGF-I) receptor gene in hepatocellular carcinoma cell lines: implications of IGF-I receptor gene activation by hepatitis B virus X gene product., *Cancer Res* 56, 3831-6.
- Kim, Y., Song, K.-S., Yoon, G., Nam, M.-J., and Ryu, W.-S. (2001). Activated ras oncogene collaborates with HBx gene of hepatitis B virus to transform cells by suppressing HBx-mediated apoptosis., *Oncogene* 20, 16- 23.
- Koga, Y., Kumashiro, R., and Yasumoto, K. (1992). Two fatal cases of hepatitis B virus carriers after corticosteroid therapy for bronchial asthma., *Internal Medicine* 31, 208-213.
- Kohno, K., Nishizono, A., Terao, H., Hiraga, M., and K., M. (2000). Reduced Transcription and Progeny Virus Production of Hepatitis B Virus Containing an 8-bp Deletion in Basic Core Promotor., *J Medical Virology* 61, 15-22.
- Koike, K., Moriya, K., Yotsuyanagi, H., Iino, S., and Kurokawa, K. (1994). Induction of cell cycle progression by hepatitis B virus HBx gene expression in quiescent mouse fibroblasts., *J Clin Invest* 94, 44-9.
- Koike, K., Shirakata, Y., Yaginuma, K., Arii, M., Takada, S., Nakamura, I., Hayashi, Y., Kawada, M., and Kobayashi, M. (1989). Oncogenic potential of hepatitis B virus., *Mol Biol Med* 6, 151-60.
- Kosovsky, M. J., Quadri, I., and Siddiqui, A. (1998). The Regulation of Hepatitis B Virus Gene Expression: An Overview of Cis- and Trans-Acting Components. In *Hepatitis B Virus: Molecular Mechanism in Disease and Novel Strategies of Therapy*, R. Koshy, and W. H. Caselmann, eds. (London, Imperial College Press), pp. 21-50.



- Kremsdorf, D., Garreau, F., Capel, F., Petit, M., and Brechot, C. (1996). In vivo selection of a hepatitis B virus mutant with abnormal viral protein expression., *J Gen Virol* 77, 929-939.
- Ktistaki, E., and Talianidis, I. (1997). Chicken Ovalbumin Upstream Promotor Transcription Factors Act as Auxiliary cofactors for Hepatocyte Nuclear Factor 4 and Enhance Hepatic Gene Expression., *Mol Cell Biol* 17, 2790-2797.
- Kunkel, T. A., and Bebenek, K. (2000). DNA replication fidelity., *Annu Rev Biochem* 69, 497-529.
- Lai, C.-K., and Ting, L. P. (1999). Transcriptional Repression of Human Hepatitis B Virus Genes by a bZIP Family Member, E4BP4., *J Virol* 73, 3197-3209.
- Lakin, N. D., and Jackson, S. P. (1999). Regulation of p53 in response to DNA damage., *Oncogene* 18, 7644- 7655.
- Lanford, R. E., Chavez, D., Brasky, K. M., Burns, R. B., and Rico-Hesse, R. (1998). Isolation of a hepadnavirus from the woolly monkey, a New World primate., *Proc Natl Acad Sci, USA* 95, 5757-5761.
- Laskus, T., Wang, L. F., Radkowski, M., Vargas, H., Cianciara, J., Poutous, A., and Rakela, J. (1997). Comparison of hepatitis B virus core promotor sequences in peripheral blood mononuclear cells and serum from patients with hepatitis B., *J Gen Viro* 78, 649-653.
- Lau, J. Y., Bain, V. G., Smith, H. M., Alexander, G. J., and Williams, R. (1992). Modulation of hepatitis B viral antigen expression by immunosuppressive drugs in primary hepatocyte culture., *Transplantation* 53, 894-898.
- Lee, H., Kim, H. T., and Yun, Y. (1998a). Liver-specific enhancer II is the target for the p53-mediated inhibition of hepatitis B viral gene expression., *J Biol Chem* 273, 19786-91.
- Lee, S. W., Lee, Y. M., Bae, S. K., Murakami, S., Yun, Y., and Kim, K. W. (2000a). Human hepatitis B virus X protein is a possible mediator of hypoxia- induced angiogenesis in hepatocarcinogenesis [In Process Citation]., *Biochem Biophys Res Commun* 268, 456-61.
- Lee, Y., Park, U. S., Choi, I., Yoon, S. K., Park, Y. M., and Lee, Y. I. (1998b). Human interleukin 6 gene is activated by hepatitis B virus-X protein in human hepatoma cells., *Clin Cancer Res* 4, 1711-7.
- Lee, Y. H., and Yun, Y. (1998). HBx protein of hepatitis B virus activates Jak1-STAT signaling., *J Biol Chem* 273, 25510-5.

- Lee, Y. I., Kin, S. O., Kwon, H. J., Park, J. G., Sohn, M. J., and Jeong, S. S. (2000b). Phosphorylation of purified recombinant hepatitis B virus-X protein by mitogen-activated protein kinase and protein kinase C in vitro., *J Virol Methods* 95, 1-10.
- Leng, X., Cooney, A. J., Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1996). Molecular mechanisms of COUP-TF-mediated transcriptional repression: evidence for transrepression and active repression., *Mol Cell Biol* 16, 2332-40.
- Li, J., Buckwold, V. E., Hon, M.-W., and Ou, J.-H. (1998a). Mechanism of Suppression of Hepatitis B Virus Precore RNA Transcription by a Frequent Double Mutation., *J Virol* 73, 1239-1244.
- Li, L., Dixon, R. J., Gu, X., and Newbold, J. E. (1998b). Comparison of the sequences of the Grey Teal, Maned Duck and Duck Hepatitis B Viruses. Paper presented at: The molecular biology of Hepatitis B Virus (University of California San Diego).
- Li, M., Xie, Y. H., Wu, X., Kong, Y. Y., and Wang, Y. (1995). HNF-3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus., *Virology* 214, 371-378.
- Lin, Y., Nomura, T., Cheong, J., Dorjsuren, D., Iida, K., and Murakami, S. (1997). Hepatitis B virus X protein is a transcriptional modulator that communicates with transcription factor IIB and the RNA polymerase II subunit 5., *J Biol Chem* 272, 7132-9.
- Lo, W. Y., and Ting, L. P. (1994). Repression of enhancer II activity by a negative regulatory element in the hepatitis B virus genome., *J Virol* 68, 1758-64.
- Locker, J., and Buzard, G. (1990). A dictionary of transcription control sequences., *J DNA Sequence* 1, 3-11.
- Lopez-Alcorocho, J. M., Moraleda, G., Bartolome, J., Castillo, I., Cotonat, T., Aguilar, J., Ortega, E., Pons, J. A., Salmeron, J., Vazquez-Iglesias, J. L., and Carreno, V. (1994). Analysis of hepatitis B precore region in serum and liver of chronic hepatitis B virus carriers., *J Hepatol* 21, 353-360.
- Lopez-Cabrera, M., Letovsky, J., Hu, K.-Q., and Siddiqui, A. (1990). Multiple liver-specific factors bind to the hepatitis B virus core/pregenomic promotor: transactivation and repression by CCAAT/enhancer binding protein., *Proc Natl Acad Sci USA* 87, 5069-5073.
- Lowe, S. W., and Lin, A. W. (2000). Apoptosis in cancer., *Carcinogenesis* 21, 485-495.

- Lu, X., Burbidge, S. A., Griffin, S., and Smith, H. M. (1996). Discordance between accumulated p53 protein level and its transcriptional activity in response to u.v. radiation., *Oncogene* 13, 413-8.
- Luckow, B., and Schütz, G. (1987). CAT constructions with multiple unique restriction sites for the functional analysis of eucaryotic promoters and regulatory elements., *Nucl Acids Res* 15, 5490.
- Lundberg, K. S., Shoemaker, D. D., Adams, M. W., Short, J. M., Sorge, J. M., and Mathur, E. J. (1991). High-fidelity amplification using a thermostable DNA polymerase isolated from *Pyrococcus furiosus*., *Gene* 108, 1-6.
- Magnius, L. O., and Espmark, J. A. (1972). New specificities in Australia antigen positive sera distinct from the Le Bouvier determinants., *J Immunol* 109, 1017-21.
- Maguire, H. F., Hoeffler, J. P., and Siddiqui, A. (1991). HBV X protein alters the DNA binding specificity of CREB and ATF-2 by protein-protein interactions., *Science* 252, 842-4.
- Mangelsdorf, D. J., Thummel, C., Beato, M., Herrlich, P., Schutz, G., Umesono, K., Blumberg, B., Kastner, P., Mark, M., and Chambon, P. (1995). The nuclear receptor superfamily: the second decade., *Cell* 83(6), 835-9.
- Marion, P. L., Oshiro, L. S., Regnery, D. C., Scullard, G. H., and Robinson, W. S. (1980). A virus in Beechey ground squirrels that is related to hepatitis B virus of humans., *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 2941-5.
- Mason, W. S., Seal, G., and Summers, J. (1980). Virus of Pekin ducks with structural and biological relatedness to human hepatitis B virus., *J Virol* 36, 829-36.
- May, P., and May, E. (1999). Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein., *Oncogene* 18, 7621- 7636.
- McMillan, J. S., Shaw, T., Angus, P. W., and Locarnini, S. A. (1995). Effect of immunosuppressive and antiviral agents on hepatitis B virus replication in vitro., *Hepatology* 22, 36-43.
- Mendel, D. B., and Crabtree, G. R. (1991). HNF-1, a Member of a Novel Class of Dimerizing Homeodomain Proteins., *J Biol Chem* 266, 677-680.
- Menzo, S., Clementi, M., Alfani, E., Bagnarelli, P., Iacovacci, S., Manzin, A., Dandri, M., Natoli, G., Levrero, M., and Carloni, G. (1993). Trans-activation of epidermal growth factor receptor gene by the hepatitis B virus X-gene product., *Virology* 196, 878-82.

- Mesnard, J.-M., and Devaux, C. (1999). Multiple Control Levels of Cell Proliferation by Human T-Cell Leukemia Virus Type 1 Tax Protein., *Virology* 257, 277- 284.
- Morozov, A., Shiyanov, P., Barr, E., Leiden, J. M., and Raychaudhuri, P. (1997). Accumulation of human papillomavirus type 16 E7 protein bypasses G1-arrest induced by serum deprivation and by the cell cycle inhibitor p21., *J Virol* 72, 8852- 8860.
- Mullis, K. B., und Faloona, F.A., (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction., *Meth Enzym* 155, 335-350.
- Nakamoto, Y., Guidotti, L. G., Pasquetto, V., Schreiber, R. D., and Chisari, F. V. (1997). Differential target cell sensitivity to CTL-activated death pathways in hepatitis B virus transgenic mice., *J Immunol* 158, 5692-5697.
- Nakanishi, M., Robetorye, R. S., Adami, G. R., Pereira-Smith, O. M., and Smith, J. R. (1995). Identifikation of the active region of the DNA synthesis inhibitory gene p21SDi1/CIP1/WAF1., *EMBO J* 14, 555-63.
- Nakanishi-Matsui, M., Hayashi, Y., Kitamura, Y., and Koike, K. (2000). Integrated Hepatitis B Virus DNA Preserves the Binding Sequence of Transcription Factor Yin and Yang 1 at the Virus-Cell Junction., *J Virol* 74, 5562-5568.
- Nalpas, B., Pourcel, C., Feldmann, G., Housset, C., Tiollais, P., Brechot, C., Berthelot, P., and Farza, H. (1992). Chronic alcohol intoxication decreases the serum level of hepatitis B surface antigen in transgenic mice., *J Hepatol* 15, 118-24.
- Natoli, G., Avantaggiati, M. L., Chirillo, P., Costanzo, A., Artini, M., Balsano, C., and Leviero, M. (1994a). Induction of the DNA-binding activity of c-jun/c-fos heterodimers by the hepatitis B virus transactivator pX., *Mol Cell Biol* 14, 989-98.
- Natoli, G., Avantaggiati, M. L., Chirillo, P., Puri, P. L., Ianni, A., Balsano, C., and Leviero, M. (1994b). Ras- and Raf-dependent activation of c-jun transcriptional activity by the hepatitis B virus transactivator pX., *Oncogene* 9, 2837-43.
- Neau, D., Schvoerer, E., Robert, D., Dubois, F., Dutronc, H., Fleury, H. J. A., and Ragnaud, J. M. (2000). Hepatitis B Exacerbation with Precore Mutant Virus Following Withdrawal of Lamivudine in a Human Immunodeficiency Virus-infected Patient., *The british Infection Society*, 192-194.

- Norder, H., Ebert, J. W., Fields, H., Mushawar, I. K., and Magnius, L. O. (1996). Complete Sequencing of a Gibbon Hepatitis B Virus Genome Reveals a Unique Genotype Distantly Related to the Chimpanzee Hepatitis B Virus., *Virology* 218, 214-223.
- Ogbourne, S., and Antalis, T. M. (1998). Transcriptional control and the role of silencers in transcriptional regulation in eukaryotes., *Biochem J* 331, 1-14.
- Oguey, D., Dumenco, L. L., Pierce, R. H., and Fausto, N. (1996). Analysis of the tumorigenicity of the X gene of hepatitis B virus in a nontransformed hepatocyte cell line and the effects of cotransfection with a murine p53 mutant equivalent to human codon 249., *Hepatology* 24, 1024-33.
- Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Sugai, Y., Yoshida, M., Moriyama, K., Tanaka, T., Miyakawa, Y., and Mayumi, M. (1994). Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen., *J Virol* 68, 8102-10.
- O'Malley, B. W. (1990). The steroid receptor superfamily more excitement predicted for the future., *Mol Endocrinol* 4, 363-369.
- Ori, A., Zauberman, A., Doitsh, G., Paran, N., Oren, M., and Shaul, Y. (1998). p53 binds and represses the HBV enhancer: an adjacent enhancer element can reverse the transcription effect of p53., *EMBO J* 17, 544-53.
- Perbal, B., ed. (1988). A practical guide to molecular cloning., 2nd Edition edn (John Wiley & Sons, Inc.).
- Petrocelli, T., Poon, R., Drucker, D. J., Slingerland, J. M., and Rosen, C. F. (1996). UV-B radiation induces p21Cip1/WAF1 and mediates G1 and S phase checkpoints., *Oncogene* 12, 1387-96.
- Poon, R. Y. C., Jiang, W., Toyoshima, H., and Hunter, T. (1996). Cyclin-dependent kinases are inactivated by a combination of p21 and Thr-14/Tyr-15 phosphorylation after UV-induced DNA damage., *J Biol Chem* 271, 13283-91.
- Preikschat, P., Meisel, H., Will, H., and Günther, S. (1999). Hepatitis B virus genomes from long-term Immunosuppressed virus carriers are modified by specific mutations in several regions., *J Gen Viro* 10, 2685-91.
- Pult, I., Chouard, T., Wieland, S., Klemenz, R., Yaniv, M., and Blum, H. E. (1997). A hepatitis B virus mutant with a new hepatocyte nuclear factor 1 binding site emerging in transplant-transmitted fulminant hepatitis B., *Hepatology* 25, 1507-15.

- Pult, I., Netter, H. J., Fröhlich, K., Kaleta, E. F., and Will, H. (1998). Identification, structural and functional analysis of a new avian Hepadnavirus from storks (STHBV). Paper presented at: The molecular biology of Hepatitis B Virus (University of California San Diego).
- Qadri, I., Maguire, H. F., and Siddiqui, A. (1995). Hepatitis B virus transactivator protein X interacts with the TATA-binding protein., *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 1003-7.
- Quant, E. (1998) Beeinflussung von Funktion und Regulation des Tumorsuppressorproteins p53 durch das Hepatitis B Virus X Protein, Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Gießen.
- Raney, A. K. (1994). Characterization of the minimal elements of the hepatitis B virus surface antigen promotor., *J Gen Virol* 75, 2671.
- Raney, A. K., Johnson, J. L., Palmer, C. N., and McLachlan, A. (1997). Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter., *J Virol* 71, 1058-71.
- Repp, R., Keller, C., Borkhardt, A., Csecke, A., Schaefer, S., Gerlich, W. H., and Lampert, F. (1992). Detection of a hepatitis B virus variant with a truncated X gene and enhancer II., *Arch Virol* 125, 299-304.
- Repp, R., von Hörsten, B., Csecke, A., Kreuder, J., Borkhardt, A., Willems, W. R., Lampert, F., and Gerlich, W. H. (1993). Clinical and immunological aspects of hepatitis B virus infection in children receiving multidrug cancer chemotherapy., *Arch Virol Suppl* 8, 103-11.
- Roberts, J. D., Bebenek, K., and Kunkel, T. A. (1988). The accuracy of reverse transcriptase from HIV-1., *Science* 242, 1171-1173.
- Roingeard, P., Romet-Lemonne, J. L., Leturcq, D., Goudeau, A., and Essex, M. (1990). Hepatitis B virus core antigen (HBcAg) accumulation in an HBV nonproducer clone of HepG2-transfected cells is associated with cytopathic effect., *Virology* 179, 113-120.
- Rossner, M. (1992). Review: Hepatitis B Virus X-Gene Product: A Promiscuous Transcriptional Activator., *Journal of Medical Virology* 36, 101-117.
- Ruesch, M. N., and Laimins, L. A. (1997). Initiation of DNA synthesis by human papillomavirus E7 oncoproteins is resistant to p21-mediated inhibition of cyclin E-cdk2 activity., *J Virol* 71, 5570- 5578.

- Sato, S., Suzuki, K., Akahane, Y., Akamatsu, K., Akiyama, K., Yunomura, K., Tsuda, F., Tanaka, T., Okamoto, H., and Miyakawa, Y. (1995). Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis., *Ann Intern Med* 122, 241-8.
- Scaglioni, P. P., Melegari, M., and Wands, J. R. (1997). Biologic properties of hepatitis B viral genomes with mutations in the precore promoter and precore open reading frame., *Virology* 233, 374-81.
- Schaefer, S., Seifer, M., Grimmsmann, T., Fink, L., Wenderhold, S., Höhne, M. W., and Gerlich, W. H. (1998a). Properties of tumour suppressor p53 in murine hepatocyte lines transformed by hepatitis B virus X protein., *J Gen Virol* 79, 767-777.
- Schaefer, S., Tolle, T., Lottmann, S., and Gerlich, W. H. (1998b). Animal Models and Experimental Systems in Hepatitis B Virus Research. In *Hepatitis B Virus: Molecular Mechanisms in Disease and Novel Strategies for Therapy*, R. Koshy, and W. H. Caselmann, eds. (London, Imperial College Press), pp. 51-74.
- Schek, N., Bartenschlager, R., Kuhn, C., and Schaller, H. (1991). Phosphorylation and rapid turnover of hepatitis B virus X-Protein expressed in HepG2 cells from a recombinant vaccinia virus., *Oncogene* 6, 1735-1744.
- Schläger, F., Schaefer, S., Metzler, M., Gratzki, N., Lampert, F., Gerlich, W. H., and Repp, R. (2000). Quantitative DNA fragment analysis for detecting low amounts of hepatitis B virus deletion mutants in highly viremic carriers. In *Pro, Hepatology* 32, 1096-105.
- Schmidt, K. (1999) Unterschiedliche Regulation der Transkription von Hepatitis B Virus Enhancer II-Varianten und viralen Genotypen., Diplomarbeit, Justus-Liebig-Universität, Giessen.
- Schuster, R., Gerlich, W. H., and Schaefer, S. (2000). Induction of Apoptosis by the Transactivating Domains of the Hepatitis B Virus X Protein Leads to Suppression of Oncogenic Transformation of Primary Rat Embryo Fibroblasts., *Oncogene* 19, 1173- 1180.
- Seifer, M., Höhne, M., Schaefer, S., and Gerlich, W. H. (1991). In vitro tumorigenicity of hepatitis B virus DNA and HBx protein., *J Hepatol* 13, S61-5.
- Shaul, Y., Rutter, W. J., and Laub, O. (1985). A human hepatitis B viral enhancer element., *EMBO J* 4, 427-430.

- Shi, H., Cullen, J. M., and Newbold, J. E. (1993). A novel isolate of duck hepatitis B virus (GenBank accession no. M95589).
- Shibata, H., Nawaz, Z., Tsai, S. Y., BW, O. M., and Tsai, M. J. (1997). Gene silencing by chicken ovalbumin upstream promoter-transcription factor I (COUP-TFI) is mediated by transcriptional corepressors, nuclear receptor-corepressor (N-CoR) and silencing mediator for retinoic acid receptor and thyroid hormone receptor (SMRT)., *Mol Endocrinol* 11, 714-24.
- Shih, W. L., Kuo, M. L., Chuang, S. E., Cheng, A. L., and Doong, S. L. (2000). Hepatitis B Virus x protein inhibits transforming growth factor-beta- induced apoptosis through the activation of phosphatidylinositol 3-kinase pathway., *J Biol Chem* 275, 25858-64.
- Shintani, Y., Yotsuyanagi, H., Moriya, K., Fujie, H., Tsutsumi, T., Kanegae, Y., Kimura, S., Saito, I., and Koike, K. (1999). Induction of apoptosis after switch-on of the hepatitis B virus X gene mediated by the Cre/loxP recombination system., *J Gen Virol* 80, 3257-65.
- Siegrist, C. A., Durand, B., Emery, P., David, E., Hearing, P., Mach, B., and Reith, W. (1993). RT RFX1 is identical to enhancer factor C and functions RT as a transactivator of the hepatitis B virus enhancer RL., *Mol Cell Biol* 13, 6375-6384.
- Simmonds, P. (2001). The origin and evolution of hepatitis viruses in humans., *J Gen Virol* 82, 693-712.
- Sladek, F. M. (1994). Hepatocyte nuclear factor 4 (HNF-4). In *Transcriptional regulation of liver specific genes.*, F. Tronche, and M. Yaniv, eds. (Austin, Texas, R. G. Landes Co.), pp. 127-142.
- Sladek, F. M., Zhong, F. M., Lai, E., and Jr. Darnell, J. E. (1990). Liver enriched transcription factor HNF-4 is a novel member of the steroid hormone receptor superfamily., *Genes Dev* 4, 2353-2365.
- Slagle, B. L., Lee, T. H., Medina, D., Finegold, M. J., and Butel, J. S. (1996). Increased sensitivity to the hepatocarcinogen diethylnitrosamine in transgenic mice carrying the hepatitis B virus X gene., *Mol Carcinog* 15, 261-9.
- Sohn, S., Jaitovitch-Groisman, I., Benlimame, N., Galipeau, J., Batist, G., and Alaoui-Jamali, M. A. (2000). Retroviral expression of the hepatitis B virus x gene promotes liver cell susceptibility to carcinogen-induced site specific mutagenesis., *Muta Res* 460, 17-28.



- Spandau, D. F., and Lee, C. H. (1988). Trans-activation of viral enhancers by the hepatitis B virus X protein., *J Virol* 62, 427-34.
- Sprengel, R., Kaleta, E. F., and Will, H. (1988). Isolation and characterization of a hepatitis B virus endemic in herons., *J Virol* 62, 3832-9.
- Standring, D. N., Ou, J. H., Masiarz, F. R., and Rutter, W. J. (1988). A signal peptide encoded within the precore region of hepatitis B virus directs the secretion of a heterogeneous population of e antigens in *Xenopus* oocytes., *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 8405-9.
- Su, F., and Schneider, R. J. (1997). Hepatitis B virus HBx protein sensitizes cells to apoptotic killing by tumor necrosis factor alpha., *Proc Natl Acad Sci USA* 94, 8744-8749.
- Su, H., and Yee, J.-K. (1991). Regulation of hepatitis B virus gene expression by its two enhancers., *Proc Natl Acad Sci USA* 89, 2708-2712.
- Su, Q., Schröder, C. H., Hofmann, W. J., Otto, G., Pichlmayr, R., and Bannasch, P. (1998). Expression of hepatitis B virus X protein in HBV-infected human livers and hepatocellular carcinomas., *Hepatology* 27, 1109-20.
- Su, T. S., Lai, C. J., Huang, J. L., Lin, L. H., Yauk, Y. K., Chang, C. M., Lo, S. J., and Han, S. H. (1989). Hepatitis B virus transcript produced by RNA splicing., *J Virol* 63, 4011-4018.
- Summers, J., O'Connell, A., and Millman, I. (1975). Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles., *Proc Natl Acad Sci USA* 72, 4597-601.
- Summers, J., Smolec, J. M., and Snyder, R. (1978). A virus similar to human hepatitis B virus associated with hepatitis and hepatoma in woodchucks., *Proc Natl Acad Sci USA* 75, 4533-7.
- Sun, C.-T., Lo, W.-Y., Wang, I.-H., Lo, L.-H., Shiou, S.-R., Lai, C.-K., and Ting, L.-P. (2001). Transcription Repression of Human Hepatitis B Virus Genes by NREBP/SON., *JBC Papers in Press* April 16.
- Suzuki, H., Sata, M., Sasaki, M., Murashima, S., Akiyoshi, F., Noguchi, S., and Tanikawa, K. (1998). Mutations of Glucocorticoid Responsive Element of HBV DNA., *Kurume Medical Journal* 45, 171-174.
- Suzuki, T., Masui, N., Kajino, K., Saito, I., and Miyamura, T. (1989). Detection and mapping of spliced RNA from a human hepatoma cell line transfected with hepatitis B virus genome., *Proc Natl Acad Sci USA* 86, 8422-8426.

- Takada, S., Kaneniwa, N., Tsuchida, N., and Koike, K. (1996). Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system., *Virology* 216, 80-9.
- Takada, S., Kaneniwa, N., Tsuchida, N., and Koike, K. (1997). Cytoplasmic retention of the p53 tumor suppressor gene product is observed in the hepatitis B virus X gene-transfected cells., *Oncogene* 15, 1895-1901.
- Takada, S., Tsuchida, N., Kobayashi, M., and Koike, K. (1995). Disruption of the function of tumor-suppressor gene p53 by the hepatitis B virus X protein and hepatocarcinogenesis., *J Cancer Res Clin Oncol* 121, 593-601.
- Tang, H., and McLachlan, A. (2001). Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear homrmon receptors is a critical determinat of viral tropism., *PNAS* 98, 1841-1846.
- Terradillos, O., Billet, O., Renard, C. A., Levy, R., Molina, T., Briand, P., and Buendia, M. A. (1997). The hepatitis B virus X gene potentiates c-myc-induced liver oncogenesis in transgenic mice., *Oncogene* 14, 395-404.
- Terradillos, O., Pollicino, T., Lecoœur, H., Tripodi, M., Gougeon, M. L., Tiollais, P., and Buendia, M. A. (1998). p53-independent apoptotic effects of the hepatitis B virus X protein in vivo and in vitro., *Oncogene* 17, 2115-23.
- Testut, P., Renard, C. A., Terradillos, O., Vitvitski-Trépo, L., Tekaiia, F., Degott, C., Blake, J., Boyer, B., and Buendia, M. A. (1996). A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska., *J Virol* 70, 4210-9.
- Thomas, P. S. (1980). Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments separated by gel electrophoresis., *Proc Natl Acad Sci USA* 77, 5201-5205.
- Tognoni, A., Cattaneo, R., Serfling, E., and Schaffner, W. (1985). A novel expression selection approach allows precise mapping of the hepatitis B virus enhancer., *Nucleic Acids Res* 20.
- Tran, A., Kremsddorf, D., Capel, F., Housset, C., Dauguet, C., Petit, M., and Brechot, C. (1991). Emergence of an takeover by hepatitis B virus (HBV) with rearrangements in the pre-S/S and pre-C/C genes during chronic HBV infection., *J Virol* 65, 3566-3574.
- Truant, R., Antunovic, J., Greenblatt, J., Prives, C., and Cromlish, J. A. (1995). Direct interaction of the hepatitis B virus HBx protein with p53 leads to inhibition by HBx of p53 response element-directed transactivation., *J Virol* 69, 1851-9.

- Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1994). Molecular mechanism of action of steroid/thyroid receptor superfamily members., *Annu Rev Biochem* 63, 451-486.
- Tsai, S. Y., Sagami, I., Wang, L. H., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1987). Interactions between a DNA-Binding transcription factor (COUP) and a non DNA binding factor (S300-II)., *Cell* 50, 701-709.
- Tsai, S. Y., and Tsai, M. J. (1997). Chick ovalbumin upstream promoter-transcription factors (COUP-TFs): coming of age., *Endocr Rev* 18, 229-40.
- Twu, J. S., and Schloemer, R. H. (1987). Transcriptional trans-activating function of hepatitis B virus., *J Virol* 61, 3448-53.
- Uchida, T., Takahashi, K., Tatsuno, K., Dhingra, U., and Eliason, J. F. (1996). Inhibition of hepatitis-B-virus core promoter by p53: implications for carcinogenesis in hepatocytes., *Int J Cancer* 67, 892-7.
- Ueda, H., Ullrich, S. J., Gangemi, J. D., Kappel, C. A., Ngo, L., Feitelson, M. A., and Jay, G. (1995). Functional inactivation but not structural mutation of p53 causes liver cancer., *Nat Genet* 9, 41-7.
- Ueda, K., Wei, Y., and Ganem, D. (1996). Cellular Factors Controlling the Activity of Woodchuck Hepatitis Virus Enhancer II., *J Virol* 70, 4714-4723.
- Ueda, K., Wei, Y., and Ganem, D. (1998). In Vivo Effects of Mutations in Woodchuck Hepatitis Virus Enhancer II., *J Virol* 72, 6608-6613.
- Vaudin, M., Wolstenholme, A. J., Tsiquaye, K. N., Zuckerman, A. J., and Harrison, T. J. (1988). The complete nucleotide sequence of the genome of a hepatitis B virus isolated from a naturally infected chimpanzee., *J Gen Virol* 69, 1383-9.
- Viviani, S., Jack, A., Bah, E., and Montesano, R. (1997). Il Carcinoma Epatocellulare: Un Cancro Prevenibile., *Epid Prev* 21, 129- 136.
- Wang, H. P., and Rogler, C. E. (1991). Topoisomerase I-mediated integration of hepadnavirus DNA in vitro., *J Virol* 65, 2381-2392.
- Wang, L. H., Ing, N. H., Tsai, S. Y., O'Malley, B. W., and Tsai, M. J. (1991). The COUP-TFs compose a family of functionally related transcription factors., *Gene Expr* 1, 207-16.
- Wang, L. H., Tsai, S. Y., Cook, R. G., Beattie, W. G., Tsai, M. J., and O'Malley, B. W. (1989). COUP transcription factor is a member of the steroid receptor superfamily., *Nature* 340, 163-6.

- Wang, X. W., Forrester, K., Yeh, H., Feitelson, M. A., Gu, J. R., and Harris, C. C. (1994). Hepatitis B virus X protein inhibits p53 sequence-specific DNA binding, transcriptional activity, and association with transcription factor ERCC3., *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 2230-4.
- Wang, X. W., Gibson, M. K., Vermeulen, W., Yeh, H., Forrester, K., Stürzbecher, H. W., Hoeijmakers, J. H., and Harris, C. C. (1995). Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene., *Cancer Res* 55, 6012-6.
- Warren, K. S., Heeney, J. L., Swan, R. A., Heriyanto, and Verschoor, E. J. (1999). A new group of hepadnaviruses naturally infecting orangutans (*Pongo pygmaeus*)., *J Virol* 73, 7860-5.
- Williams, J. S., and Andrisani, O. M. (1995). The hepatitis B virus X protein targets the basic region-leucine zipper domain of CREB., *Proc Natl Acad Sci USA* 92, 3819-23.
- Wu, J. C., Merlino, G., and Fausto, N. (1994). Establishment and characterization of differentiated, nontransformed hepatocyte cell lines derived from mice transgenic for transforming growth factor alpha., *Proc Natl Acad Sci USA* 91, 674-8.
- Xie, Y. H., Li, M., Wang, Y., Hofschneider, P. H., and Weiss, L. (2001). Site-specific mutation of the hepatitis B virus enhancer II B1 element: effect on virus transcription and replication., *J Gen Virol* 82, 531-5.
- Yang, W., and Summers, J. (1995). Illegitimate replication of linear hepadnavirus DNA through nonhomologous recombination., *J Virol* 70, 4567-4575.
- Yang, W. G., Mason, W. S., and Summers, J. (1996). Covalently closed circular viral DNA formed from two types of linear DNA in woodchuck hepatitis virus-infected liver., *J Virol* 70, 4567-4575.
- Yee, J.-K. (1989). A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus., *Science* 245, 658-661.
- Yu, M.-W., Cheng, S.-W., Lin, M.-W., Yang, S.-Y., Liaw, Y.-F., Chang, H.-C., Hsiao, T.-J., Lin, S.-M., Lee, S.-D., Chen, P.-J., *et al.* (2000). Androgen-Receptor Gene CAG Repeats, Plasma Testosterone Levels, and Risk of Hepatitis B-Related Hepatocellular Carcinoma., *Journal of National Cancer Institute* 92, 2023-2028.
- Yu, X., and Mertz, J. E. (1996). Promoters for synthesis of the pre-C and pregenomic mRNAs of human hepatitis B virus are genetically distinct and differentially regulated., *J Virol* 70, 8719-26.

- Yu, X., and Mertz, J. E. (1997). Differential regulation of the pre-C and pregenomic promoters of human hepatitis B virus by members of the nuclear receptor superfamily., *J Virol* 71, 9366-9374.
- Yu, X., and Mertz, J. E. (2001). Altered NRRE function in a naturally occurring HBV variant. Paper presented at: 2001 Meeting on: The molecular Biology of Hepatitis B viruses (Amherst, Massachusetts, USA).
- Zanetti, A., Tanzi, E., Manzillo, G., Maio, G., Sbreglia, C., Caporaso, N., Thomas, H., and Zuckerman, A. J. (1988). Hepatitis B variant in Europe., *Lancet* 12, 1132-1133.
- Zheng, Y., and Yen, T. (1994). Negative regulation of hepatitis B virus gene expression and replication by oxidative stress., *J Biol Chem* 12, 8857-62.
- Zhichang, X., Jensen, G., and Yen, B. T. S. (1997). Activation of Hepatitis B Virus S Promotor by the Viral Large Surface Protein via Induction of Stress in the Endoplasmatic Reticulum., *J Virol* 71, 7387-7392.
- Zhou, D.-X., and Yen, T. S. B. (1991a). The hepatitis B virus S promotor compromises a CCAAT motif and two initiation regions., *J Biol Chem* 266, 23416.
- Zoulim, F., Saputelli, J., and Seeger, C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo., *J Virol* 68, 2026-30.
- Zuckerman, J. N., and Zuckerman, A. J. (2000). Current topics in hepatitis B., *J Infect* 41, 130-6.

## Abkürzungen

μ	mikro (10 <sup>-6</sup> )
A	Ampere
Abb.	Abbildung
Amp	Ampicillin
AP1	Aktivator Protein 1
APS	Amoniumpersulfat
ASHV	Arctic Squirrel Hepatitis Virus
ATP	Adenosintriphosphat
ATF-2	Activating Transcription Factor
BCA	bicinchoninic acid
BSA	Bovines Serumalbumin
bp	Basenpaare
CAT	Chloramphenicol-Acetyl-Transferase
C/EBP	CCAAT-Enhancer binding protein
Ci	Curie
Cip	CDK interagierendes Protein
ChHBV	Schimpansen Hepatitis B Virus
CMV	Zytomegalievirus
COUP-TF1	Chicken ovalbumin upstream promotor transcription factor
Cp	Core Promotor
CPM	Counts pro Minute
CREB	cAMP-responsive-Element bindendes Protein
CTP	Cytosintriphosphat
C-Terminus	Carboxyterminus
Cu	Kupfer
Δ	Deletion
DC	Dünnschichtchromatographie
DEPC	Diethylpyrocarbonat
ddH <sub>2</sub> O	Doppelt destilliertes Wasser
DHBV	Duck Hepatitis B Virus
DMSO	Dimethylsulfoxid

DNS	Desoxyribonukleinsäure
DR1	direct repeat 1
DR2	direct repeat 2
DTT	Dithiothreitol
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EMSA	Elektrophoretic-mobility-shift-assay
Enh	Enhancer
et al.	Et alia (und andere)
Fa.	Firma
FKS	Fötales Kälberserum
Fos	Einkel-Biskis-Jinkins Murine Osteogenic Sarcoma Virus
FTF	fetoprotein transcription factor
g	Gramm
GE	Genomäquivalente
GiHBV	Gibbon Hepatitis B Virus
GoHBV	Gorilla Hepatitis B Virus
GRBB	Gelretardations-binding-buffer
GRE	glucocorticoid responsive element
GSHV	Groundsquirrel Hepatitis Virus
GTHBV	Grey Teal Hepatitis B Virus
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
HBc	Hepatitis B core Protein
HBeAg	Hepatitis B e-Antigen
HBsAg	Hepatitis B Oberflächen Antigen
HBV	Hepatitis B Virus
HBx	Hepatitis B X-Protein
HCC	Hepatozelluläres Karzinom
HCV	Hepatitis C Virus
HHBV	Heron Hepatitis B Virus
HPV	Humanes Papillomavirus
HNF	Hepatocyte nuclear factor
Hsp90	Hitzeschockprotein 90

kB	Kilobase(n)
l	Liter
LB	Luria-Bertani-Medium
LHBs	großes Hepatitis B Hüllprotein
m	milli ( $10^{-3}$ )
M	molar (Mol/Liter)
MAPK	Mitogen-Activated Protein Kinase
MCS	Multiple Klonierungs Stelle
MDHBV	Maned Duck Hepatitis B Virus
MHBs	mittleres Hepatitis B Hüllprotein
Min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mRNS	messenger Ribonukleinsäure
n	nano ( $10^{-9}$ )
NF-1	nuclear factor 1
NF- $\kappa$ B	<u>N</u> uclear Factor $\kappa$ Chain Transcription in B Cells
NRE	Negativ-regulatorisches Element
NREBP	NRE binding Protein
NRRE	nuclear receptor responsible element
NTP	Nukleotidtriphosphat
N-Terminus	Aminoterminus
ORF	offener Leserahmen
OuHBV	Orangutan Hepatitis B Virus
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
p	pico ( $10^{-12}$ )
$^{32}\text{P}$	Phosphat $^{32}$
poly A	Polyadenylierungs-Signal
p53	Tumorsuppressorprotein p53
p21	Cyclin Kinase Inhibitors p21
PBS	Phosphat Buffered Saline
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PKC	Proteinkinase C
Pol	Hepatitis B Polymerase



PPAR	Peroxisome Proliferator-aktivierter Rezeptor
PRE	Post-transkriptionales-regulatorisches Element
PVDF	Polyvinylendifluorid
RNS	Ribonukleinsäure
RGHV	Ross Goose Hepatitis Virus
RPA	Ribonuklease Protection Assay
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkriptase
RT	Reverse Transkription
RXR	retinoid X receptor
s	Sekunde(n)
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sdi	Senescent Cell-Derived Inhibitor
Sek.	Sekunden
SHBs	kleines Hepatitis B Hüllprotein
SGHBV	Snow Goose Hepatitis B Virus
Sp1	SV40 promotor protein 1
Std.	Stunde
STHBV	Stork Hepatitis B Virus
SV40	Simian Virus 40
Tab.	Tabelle
T-Ag	Tumorantigen
TBP	TATA-Box-bindendes Protein
TAE	Tris/Acetat/EDTA
TBE	Tris/Borsäure/EDTA
TE	Tris/EDTA
TF	Transkriptionsfaktor
TFG	Transforming Growth Factor
t-RNS	transfer Ribonukleinsäure
TTP	Thymidintriphosphat
U	Unit(s), Enzymeinheit
Ü.N.	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	ultraviolett

---

V	Volt
Waf	p53-Wildtyp aktivierter Faktor
w/v	Gewicht pro Volumen
w/w	Gewicht pro Gewicht
WHV	Woodchuck Hepatitis Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WMHBV	Wooly Monkey Hepatitis B Virus
Wt	Wiltyp
X	Hepatitis B X-Protein
YY1	Transkriptionsfaktor Yin-Yang 1

## Danksagung

Herrn Professor Dr. W. H. Gerlich danke ich für die Unterstützung dieser Arbeit und für die konstruktive Kritik bei der Abfassung dieser Dissertation.

Herrn Professor Dr. R. Renkawitz danke ich für die Vertretung dieser Arbeit vor dem Fachbereich Biologie.

Ganz besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Stephan Schaefer für die Überlassung des Themas, die große Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente, die engagierte wissenschaftliche Betreuung und das stets offene Ohr für private und berufliche Fragen bedanken.

Frau Dr. M. Linder danke ich für die Durchführungen der Experimente am MALDI-TOF-MS und die anschließende Sequenzanalyse.

Herrn P. Dotzauer danke ich für die Durchführung des *in-situ* Verdaus für die anschließende Peptid Massenfingerprint Analyse.

Frau Sigrun Broehl danke ich für die Hilfe bei der Herstellung der Kernextrakte und ihre allgemeine Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

Frau Katja Schmidt danke ich für ihre Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Experimente.

Herrn Dr. Michael Kann danke ich für die Hilfe bei der Erstellung der Abbildung zur Genomorganisation.

Herrn Ralph Schuster danke ich für seine stetige Hilfsbereitschaft bei der Beantwortung von Fragen im Laboralltag und für sein Hilfe beim Korrekturlesen.

Besonderer Dank gilt auch Frau Tanja Tolle ohne deren Rat im Privaten und Beruflichen vieles nicht möglich gewesen wäre.

Gedankt sei außerdem allen ehemaligen und derzeitigen Mitarbeitern des Institutes für Medizinische Virologie die mich während meiner Arbeit unterstützt haben und mir mit Rat und Tat zur Seite standen.

Vielen Dank auch an alle meine Freunde, die mir während dieser Zeit zur Seite standen.

Außerdem möchte ich meinem Stiefvater Stefan Haenelt, meinem Vater Udo Fiedler und meiner Mutter Lilly Götz-Haenelt für ihre großartige Unterstützung danken.

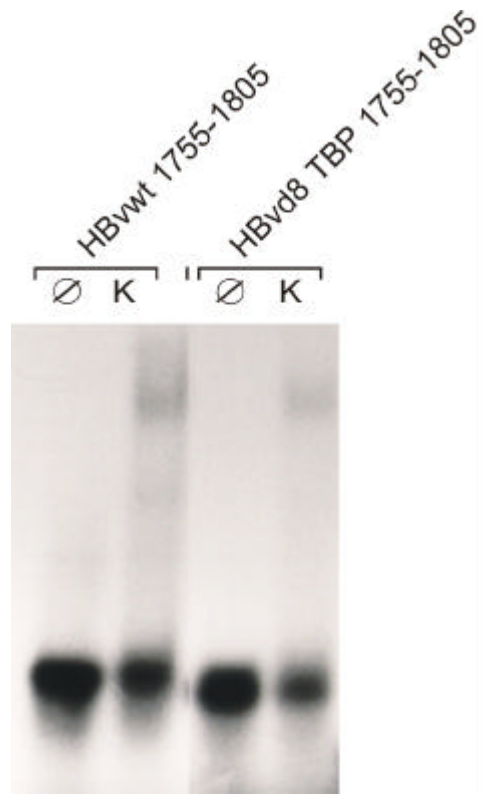
Nicht zuletzt möchte ich meiner Tochter Sarah für die oft anstrengende, aber auch sehr schöne und unterhaltsame Abwechslung in dieser Zeit danken.

## Addendum

zur Inaugural-Dissertation: „Einfluß exogener Faktoren auf die Transkriptionsregulation des Hepatitis B Virus“ von Nicola Fiedler, Gießen 2001

Folgende Angaben ergänzen, die dem naturwissenschaftlichen Fachbereich (Fachbereich Biologie) der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Erlangung des Doktorgrades Inaugural-Dissertation vorgelegte Dissertation:

- 1.) Es ist richtig, daß keine Aussage getroffen werden kann, ob p53 oder irgendein unbekanntes UV-induziertes Protein die Repression des HBV-Enhancer I/HBx-Promotors bewirkt (Kapitel 4.1). Mittlerweile gibt es Expressionsplasmide für den Carboxyterminus von p53, die spezifisch p53 inhibieren. Diese Inhibitoren waren zum Zeitpunkt der Experimente nicht verfügbar.
- 2.) Alle Northern-Blots wurden sorgfältigst auf gleichmäßige Beladung überprüft (Kapitel 3.3.3). Zusätzlich wurden bei den Experimenten zur Induktion von p21-RNA in AML12-Zellen Hybridisierungen mit einer Sonde für GAPDH durchgeführt. Diese Hybridisierungen wurden nicht gezeigt, da die GAPDH-Sonde nur sehr schwache Banden ergaben.
- 3.) Die quantitativen Aussagen zur Affinität der wt- und Variantensequenz lassen sich nicht durch Abb. 4.5 und 4.6 belegen. Abb. 4.6a zeigt dies etwas besser.
- 4.) Die in Abb. 4.12 und an anderen Stellen im Text fälschlicher Weise verwendete Bezeichnung „Fingerprint“ für den „Footprint“ wird vor Drucklegung verbessert.
- 5.) In Abb. 4.12 wurde die durchgeführte Kontrolle (Footprint ohne Kernextrakt) nicht gezeigt, da die DNA vollständig verdaut wurde und die Kontrollspuren leer erschienen.



**Abb.4.6a: Gelretardationsanalyse (Elektrophoretic mobility shift Assays (EMSA)) der Oligonukleotide (1755-1805) mit und ohne Kernextrakt aus HepG2 Zellen.** Die Oligonukleotide nt 1755-1805 für den Wildtyp oder die 8bp Deletion wurden mit  $^{32}\text{Pd}$ -CTP radioaktiv markiert und mit/ohne (K/Ø) Kernextrakt aus HepG2 Zellen im EMSA eingesetzt. Nach der Auftrennung über ein Polyacrylamid Gel wurde dieses getrocknet und über Nacht auf einen Röntgenfilm exponiert.

- 6.) Zur Verbesserung der Affinitätsreinigung NRRE (Kernrezeptor responsives Element des HBV Enhancer II) bindender Proteine wurde durch Zugabe eines zehnfachen molaren Überschusses eines Oligonukleotids gleicher Basenzusammensetzung aber zufälliger Sequenz versucht (Kapitel 4.8).